THÈSES

PRÉSENTÉES

A LA FACULTÉ DES SCIENCES
DE L'UNIVERSITÉ D'AIX-MARSEILLE

POUR OBTENIR

LE GRADE DE DOCTEUR ÈS SCIENCES PHYSIQUES

PAR

Robert CORDONNIER

Ire THÈSE

RECHERCHES SUR L'AMINO-CARBOXYPEPTIDASE (DIPEPTIDASE) DE *SACCHAROMYCES CEREVISIAE* HANSEN VAR. *ELLIPSOIDEUS*

2e THÈSE

Propositions données par la Faculté

Soutenues le 28 juin 1966 devant la Commission d'examen :

MM. P. DESNUELLE *Président*

E. NÈGRE
G. MARCHIS-MOUREN } *Examinateurs*

INSTITUT NATIONAL DE LA RECHERCHE AGRONOMIQUE
149, rue de Grenelle, Paris - 7e

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41545823_0042

THÈSES

PRÉSENTÉES

A LA FACULTÉ DES SCIENCES
DE L'UNIVERSITÉ D'AIX-MARSEILLE

POUR OBTENIR

LE GRADE DE DOCTEUR ÈS SCIENCES PHYSIQUES

PAR

Robert CORDONNIER

Ire THÈSE

RECHERCHES SUR L'AMINO-CARBOXYPEPTIDASE (DIPEPTIDASE) DE *SACCHAROMYCES CEREVISIAE* HANSEN VAR. *ELLIPSOIDEUS*

2e THÈSE

Propositions données par la Faculté

Soutenues le 28 juin 1966 devant la Commission d'examen :

MM. P. DESNUELLE — *Président*

E. NÈGRE
G. MARCHIS-MOUREN } *Examinateurs*

INSTITUT NATIONAL DE LA RECHERCHE AGRONOMIQUE
149, rue de Grenelle, Paris - 7e

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

UNIVERSITÉ D'AIX-MARSEILLE
FACULTÉ DES SCIENCES DE MARSEILLE

Doyens honoraires : MM. MARCHAUD, TRAYNARD, CORROY, CHOUX.

Professeurs honoraires : MM. J. MARCHAUD, E. TRAYNARD, G. PETIT, R. THIRTY, J. BOSLER, A. TIAN, L. MARGAILLAN, P. BENOIT, H. CABANNES, P. CHOUX, G. LIANDRAT, R. CERIGHELLI, C. CORROY, L. ROYER.

Doyen : M. P. ROUARD — Assesseurs : MM. A. GUILLEMONAT, J. M. PERES.

Secrétaire principal honoraire : M. H. LANFRANCHI.

Conseiller, chef des services administratifs : M. C. MOYNAULT.

PROFESSEURS

J. VALENSI	T	Mécanique expérimentale des fluides.
P. ROUARD	T	Physique générale.
H. PRAT	T	Botanique.
P. DESNUELLE	T	Chimie biologique.
M. ABELOOS	T	Biologie générale.
R. MÉRIGOUX	T	Physique industrielle.
P. VINCENSINI	T	Calcul différentiel et intégral.
C. FEHRENBACH	T	Astronomie.
A. FAVRE	T	Mécanique de l'atmosphère et météorologie.
A. GUILLEMONAT	T	Chimie industrielle.
J. M. PÉRÈS	T	Océanie biologique.
G. CARPENI	T	Chimie M. P. C.
C. JAUSSERAN	T	Physique expérimentale.
R. MOLINIER	T	Biologie végétale.
Y. DOUCET	T	Physique M. P. C.
J. M. SOURIAU	T	Méthodes mathématiques de la physique.
P. COTTON	T	Électronique.
J. METZGER	T	Chimie S. P. C. N.
J. TIMON-DAVID	T	Zoologie.
L. FOURÈS	T	Mathématiques.
D. MALE	T	Physique.
G. RODIOU	T	Mathématiques appliquées.
M. NAUDET	T	Chimie des corps gras.
J. PAILLARD	T	Psycho-physiologie.
L. SAVIDAN	T	Chimie systématique.
D. KASTLER	T	Physique théorique.
P. BOUSQUET	T	Physique S. P. C. N.
P. PESTEIL	T	Physique C. P. E. M.
P. CASAL	T	Mécanique rationnelle et appliquée.
C. GOUVERNET	T	Géologie appliquée.
A. VISCONTI	T	Physique théorique.
A. BLANCHARD	T	Mathématiques générales.
M. DUSSARDIER	T	Physiologie animale.
M. PERROT	T	Physique.
P. QUEZEL	T	Botanique.
E. CRAUSSE	T	Physique (Avignon).
A. JULG	T	Chimie théorique.
Mme TAXY	T	Géologie historique.
R. MONIER	T	Chimie biologique.
Mm FURNESTIN	T	Biologie animale S.P.C.N
M. BERTRAND	T	Chimie S. P. C. N.
J. TROMPETTE	T	Physique S. P. C. N.
A. ARAGNOL	T	Mathématiques.
M. LAFITTE	T	Chimie M. P. C.
R. FRAISSE	T	Mathématiques.
Mme BLANCHARD	T	Mathématiques.
R. NÈGRE	T	Biologie végétale.
A. PENELOUX	T	Chimie.
R. BUVAT	T	Cytologie et biologie végétale.
R. COULON	T	Physique.
H. MOREL	T	Analyse numérique.
F. TESSIER	T	Géologie générale.
R. KERN	T	Minéralogie.

PROFESSEURS SANS CHAIRE

Mlle CLARION	T	Mécanique des fluides.
R. AMAR	T	Biologie animale S. P. C. N
J. CHOUTEAU	T	Physiologie animale.
L. DEVÈZE	T	Biologie marine.
H. CHANTREL	T	Physique de l'espace.
L. SIDÉRIADES	T	Dynamique des vibrations.
J. MANDELBROJT	T	Physique nucléaire.
F. BOREL	T	Techniques mathématiques de la physique.
J. BLANC	T	Géologie marine.
Mlle CHANDEBOIS	T	Biologie animale.
A. BOURDILLON	T	Biologie animale.
R. PHILIP	T	Physique.
M. BIZOUARD	T	Physique.
H. GUENOCHE	T	Mathématiques appliquées.
J. RICARD	T	Botanique.
J.-M. SURZUR	T	Chimie organique
J.-P. DAVID	T	Physique.
H. BODOT	T	Chimie.
J. C. TRAYNARD	T	Chimie industrielle.
G. DUCET	T	Agronomie tropicale.
Mme TISON	T	Mathématiques (Avignon).
R. MOLINIER	T	Biologie végétale.
J. HENNEQUIN	T	Électronique.
L. CAPÉLIA	T	Minéralogie.
J. C. MAIRE	T	Chimie C. P. E. M.
Y. POIRIER	T	Physique (Avignon).

MAITRES DE CONFÉRENCES

H. PATIN	T	Chimie M. P. C.
S. COMBET	T	Chimie.
M. ZERNER	T	Mathématiques M. P. C.
Mlle LAGARDE	T	Chimie minérale.
Mlle GUEIRARD	T	Pétrographie.
C. FEUGEAS	T	Chimie.
J. CABANE	T	Chimie.
G. RASIGNI	T	Physique.
H. BACRY	T	Physique théorique.
G. LAPLUYE	T	Chimie (C. E. S. S. La Réunion).
Mme CARBONNEL	T	Chimie (Avignon).
R. GARRON	T	Physique expérimentale.
J. BOULON	T	Astronomie.
Mlle PICHENOT	T	Biologie végétale.
M. SIMON	T	Physiologie animale.
M. CADILHAC	T	Physique.
A. PONS	T	Biologie végétale.
M. EGO	T	Mathématiques (C. E. S. S. La Réunion).
G. MARCHIS-MOUREN	T	Chimie biologique.
BILLARD	T	Mathématiques (Avigéon).

CHARGES DE CONFÉRENCES

J. MORIN	T	Neurophysiologie.
H. GAVINI	T	Psycho-physiologie.
P. JEAN	T	Physique.
J. SENEZ	T	Chimie biologique.
Mme COTTON	T	Mathématiques.
H. GASTAUD	T	Neurophysiologie.
Mme SCHACHTER	T	Écologie terrestre et limnique
L. CASSAND	T	Physiologie animale.

L. GARNIER ..... T Physiologie animale.
A. GILET ..... T Mathématiques.
J. HALADJIAN .... T Chimie M. P. C.
J. CARMONA ..... T Mathématiques M. P. C.
M. BOURG ..... T Physique C. P. E. M.
A. ROBILLARD .... T Chimie.
J. GONELLA ..... T Physique.
PEIFFER ..... T Chimie.

J. VALLIER ..... T Physique.
P. BOIVINET ..... T Chimie.
R. DUMAS ..... T Mathématiques.
M. BENARROCHE .. T Physique.
L. SARDA..... T Chimie biologique.
LADZUNSKI ..... T Chimie biologique.
J. P. ROGGERO ... T Chimie.
J. CRESP ..... T Biologie animale.

A mes parents,
A ma femme,
A mon frère,
tombé au champ d'honneur le 29 janvier 1945.

Je remercie particulièrement Monsieur le Professeur DESNUELLE qui a inspiré et dirigé ces recherches et me fait l'honneur de présider ce jury.

Je remercie Monsieur le Professeur MARCHIS-MOUREN qui me fait l'honneur de juger ce travail.

Je remercie Monsieur le Professeur NEGRE qui m'a toujours soutenu avec compréhension et bienveillance.

Je dois aussi beaucoup à l'Institut national de la Recherche agronomique grâce auquel j'ai pu préparer cette thèse.

RECHERCHES SUR L'AMINO-CARBOXYPEPTIDASE (DIPEPTIDASE) DE *SACCHAROMYCES CEREVISIAE* HANSEN VAR. *ELLIPSOIDEUS*

PLAN

Avant-Propos.

Introduction.

L'équipement protéolytique de Saccharomyces cerevisiae.
Les amino-carboxypeptidases d'origine animale.
Discussion de l'action des métaux sur l'activité des amino-carboxypeptidases.

Chapitre premier. — Recherches préliminaires.

Activités peptidasiques de Saccharomyces cerevisiae *var.* ellipsoïdeus.
Identification de la fraction amino-carboxypeptidasique.
Choix des substrats d'étude du matériel amino-carboxypeptidasique.

Chapitre II. — Extraction et purification du matériel amino-carboxypeptidasique.

Description de la technique.
Justification de la technique :
Élimination du matériel aminopeptidasique,
des polysaccharides,
dss acides nucléiques,
des protéines inactives.

Chapitre III. — Étude du matériel amino-carboxypeptidasique isolé.

Spécificité.
Stabilité.
Nature thio-métalloprotéique.

Chapitre IV. — Recherche de la pluralité éventuelle du matériel amino-carboxypeptidasique.

Caractères communs aux activités A G et G G.
Différenciation des activités A G et G G.
Essais de séparation des enzymes.

Chapitre V. — Le matériel amino-peptidasique de *Saccharomyces cerevisiae ellipsoïdeus.*

Conclusions.

AVANT-PROPOS

Avant d'aborder le sujet de ce travail, il nous paraît utile de définir aussi précisément que possible les enzymes dont il sera question afin de les situer par rapport aux enzymes de la même famille qui peuvent coexister avec eux dans le milieu biologique étudié. Ce préliminaire est d'autant plus indispensable que les terminologies utilisées pour désigner les enzymes protéolytiques sont quelques peu ambiguës car elles reposent en fait beaucoup plus sur la manifestation indirecte de leur spécificité que sur leur spécificité elle-même.

Ainsi les noms souvent donnés de *protéinases*, aux enzymes capables de scinder les grosses molécules protéiques en polypeptides, et de *peptidases*, à celles capables d'hydrolyser les molécules peptidiques en acides aminés, introduisent un concept de spécificité liée au substrat et à sa taille moléculaire, alors que les « protéinases » bien caractérisées, hydrolysent des peptides simples convenablement substitués aussi rapidement que leurs substrats protéiques et que certaines « peptidases », comme la leucine-amino-peptidase du rein de porc et les carboxypeptidases pancréatiques, sont susceptibles d'attaquer des substrats protéiques.

De même le nom de dipeptidase qui désigne les enzymes capables d'hydrolyser seulement les dipeptides, pourrait laisser supposer que ceux-ci peuvent être considérés comme spécifiques des dipeptidases alors qu'ils peuvent être hydrolysés aussi par d'autres peptidases.

On désigne encore sous les vocables respectifs d'*endopeptidases* et d'*exopeptidases*, les protéinases et les peptidases qui rompent les liaisons peptidiques, les premières à l'intérieur, les secondes aux extrémités des chaînes peptidiques du substrat. Cette seconde terminologie colle davantage aux faits expérimentaux : vis-à-vis des protéines, le résultat principal de leur hydrolyse par les endopeptidases est de les transformer en peptides contrairement à l'action des exopeptidases qui se traduit par la libération d'acides aminés. Il ne faudrait cependant pas en déduire un nouveau concept de spécificité, adapté cette fois à la situation de la liaison sensible à l'intérieur ou aux extrémités du substrat : la pepsine en effet n'agit pas apparemment autrement qu'une exopeptidase dans son attaque autolytique qui se traduit par une libération importante de tyrosine et pas autrement que la carboxypeptidase A dans l'hydrolyse de la CBZ - lglutamyl-ltyrosine ; de même la trypsine, n'étant pas inhibée par un α-NH_2, peut attaquer les acides aminés basiques N terminaux des substrats correspondant à sa spécificité.

Il suffit donc que le substrat réponde à ses exigences de spécificité pour que l'endopeptidase soit douée d'activité exopeptidasique ou pour que la « protéinase » et la « peptidase » soient douées respectivement d'activités peptidasique et proétinasique.

Ces quelques exemples montrent l'insuffisance du substrat à définir correctement un enzyme et la *nécessité d'une terminologie directement reliée à ses exigences de spécificité.*

En ce qui concerne les exopeptidases, un des critères bien établi de leur spécificité est l'influence, sur la sensibilité de la liaison peptidique à l'hydrolyse enzymatique, des groupes polaires libres COOH et NH_2 adjacents à cette liaison : les carboxypeptidase, aminopeptidase et dipeptidase se distinguent entre elles par leur exigence respective pour un groupe α-COOH, un groupe α-NH_2 ou pour à la fois un groupe α carboxylique et α aminé libres.

Cette terminologie définit parfaitement les *carboxypeptidases* et *aminopeptidases* car elle traduit sans ambiguïté un des caractères essentiels de leur spécificité, mais beaucoup moins bien, nous l'avons vu, les dipeptidases.

Il en est d'ailleurs résulté une incertitude sur la spécificité d'enzymes décrits parfois comme dipeptidases sur la seule base de leur activité vis-à-vis des dipeptides.

Aussi proposons-nous pour les dipeptidases, le terme d'*amino-carboxypeptidase* qui offre le double avantage de rendre homogène la classification des exopeptidases et d'être non équivoque.

En effet, ainsi désignées comme amino-carboxypeptidases, c'est-à-dire comme exigeant à la fois un groupe α-aminé et un groupe α-carboxylique, les dipeptidases sont définies aussi précisément que possible par rapport, non seulement évidemment aux peptidases qui n'hydrolysent pas les dipeptides parce qu'inhibées par la présence au voisinage immédiat de la liaison sensible soit d'un groupe aminé libre (carboxypeptidase, pepsine), soit d'un groupe carboxylique libre (chymotrypsine, certaines aminopeptidases), mais aussi par rapport aux aminopeptidases dont l'activité n'est pas sensiblement affectée par le blocage du COOH adjacent à la liaison sensible et qui hydrolysent donc aussi les dipeptides.

Du point de vue expérimental, ce terme d'amino-carboxypeptidase met l'accent sur la nécessité de mettre en évidence les exigences de l'enzyme vis-à-vis de groupes polaires libres à l'aide de dipeptides convenablement substitués.

***

Les travaux qui se rapportent aux amino-carboxypeptidases sont anciens pour la plupart et beaucoup des résultats obtenus incertains en raison du peu de pureté le plus souvent des extraits étudiés et parfois aussi du choix inadéquat des substrats d'identification.

De ce fait nos connaissances sur ces enzymes sont encore limitées en regard de ce que nous savons sur certaines aminopeptidases et carboxypeptidases obtenues hautement purifiées.

Dans ces conditions leur étude méritait d'être reprise. L'analyse des travaux réalisés sur elles, qui sera faite dans l'introduction, montre l'intérêt d'une telle étude et justifie l'orientation que nous avons donnée à ce travail.

La levure a été choisie comme matériel enzymatique en raison des travaux dont elle a été l'objet, de l'abondance et de la variété de ses activités spécifiques des dipeptides à propos desquelles des problèmes ont été posés dans les mêmes termes que pour les amino-carboxypeptidases animales, problèmes de spécificité notamment, reliés aux activateurs métalliques.

La partie expérimentale de ce travail est divisée en cinq chapitres : après avoir fait un bilan des activités peptidasiques de la levure et recherché la part des amino-carboxypeptidases dans ses activités dipeptidasiques (chap. I), une méthode d'extrac-

tion et de purification de la fraction amino-carboxypeptidasique a été mise au point (chap. II) et quelques-unes de ses propriétés étudiées, celles notamment reliant son activité à la présence des métaux (chap. III) ; enfin le problème de sa spécificité restreinte aux acides aminés constitutifs des substrats testés a été abordé en essayant de séparer les différentes amino-carboxypeptidases éventuelles (chap. IV). Le dernier chapitre est consacré au bilan des connaissances acquises indirectement au cours de ce travail, sur le matériel aminopeptidasique de la levure étudiée.

INTRODUCTION

Cette introduction comprend trois parties : la première est consacrée à une rapide description de l'équipement protéolytique de la levure, la seconde à une analyse de ce que nous savons des amino-carboxypeptidases d'origine animale afin de mieux situer le problème des amino-carboxypeptidases de la levure, notamment en ce qui concerne leur activation par les métaux qui sera discutée dans la troisième partie.

I — L'équipement protéolytique de la levure

La levure constitue pour l'enzymologiste un matériel biologique qui, par le très grand nombre d'enzymes variés qu'elle renferme à l'état dilués, présente une certaine analogie avec les tissus animaux dont sont extraits les enzymes protéolytiques intracellulaires (cathepsines) mais se distingue tout à fait des sécrétions exocrines pancréatique ou gastrique où les enzymes protéolytiques extracellulaires se trouvent en petit nombre à une forte concentration.

Il n'y a pas en effet de différenciation entre les cellules d'une colonie, aussi chacune produit-elle tous les enzymes nécessaires à ses activités métaboliques. Ainsi quelques 150 enzymes ont été jusqu'ici identifiés dans les cellules de différentes espèces de *Saccharomyces* essentiellement.

La part qui revient à ces enzymes dans les protéines totales de la cellule est difficile à établir parce que « la protéine » de la levure est un matériel incertain souvent défini très imprécisément par la teneur en azote total des cellules entières $\times$ 6,25 sans tenir compte des formes d'azote non protéique, parce que aussi la teneur en protéine peut varier suivant la souche et le milieu de culture. On peut cependant se faire une idée de leur concentration, par rapport aux protéines présentes dans les extraits bruts, à partir des données expérimentales concernant ceux d'entre eux qui ont été obtenus purifiés. Dans ces cas, la protéine enzymatique représente souvent moins de 1 p. 100 des protéines extraites et le plus souvent moins de 0,1 p. 100 ; les rendements par kg de levures sèches étant rarement supérieurs au gramme et en général de quelque 50 à 500 mg.

A l'opposé, 90 p. 100 des protéines du suc pancréatique sont représentés par seulement dix enzymes et près de 75 p. 100 par les seules protéases ou leurs zymogènes (Keller et *al.*, 1958) (Marchis-Mouren et *al.*, 1961). A partir de 1,5 litre d'extrait pancréatique. Green et Neurath (1954) obtiennent 1 gr de carboxypeptidase A cristallisée 6 fois alors que le même volume d'extrait brut de la levure nous donne environ 100 mg de « dipeptidase » purifiée 50 fois par rapport à AG et 200 fois par rapport à GG.

La cellule de levure a pour autre originalité sa teneur particulièrement élevée en matériaux non protéiques divers, notamment acides nucléiques, phosphates

condensés, polysaccharides que l'on retrouve en grande partie dans les extraits enzymatiques bruts obtenus nécessairement par broyage ou plasmolyse des cellules, étant donné la faible diffusion de ses enzymes à l'extérieur de la cellule.

A cet égard la levure se distingue de nombreux champignons et bactéries dont les protéases sont excrétées dans le milieu et peuvent être isolées à partir des filtrats de culture en laissant dans les cellules une partie du matériel non enzymatique. Citons parmi les exemples les plus récents : les protéases de *Penicillium janthinellum* (Hoffmann et Schaw, 1964) et de *Streptococcus lactis* (Williamson et *al.*, 1964).

***

L'équipement protéolytique dont il sera question ici, concerne celui de *Saccharamyces cerevisiae* de différentes origines technologiques (brasserie, boulangerie).

La présence dans la levure d'enzymes susceptibles d'hydrolyser les protéines et les peptides simples est connue depuis longtemps (Vines, 1903 ; Dernby, 1917). Parmi eux Willstätter et Grassmann (1926-1936) ont réussi à séparer d'un enzyme hydrolysant les protéines, une aminopeptidase et une « dipeptidase ».

C'est à partir de ces préparations extraites de la levure qu'ont été précisées les spécificités amino et amino-carboxypeptidasique et introduits les termes d'aminopeptidase et de « dipeptidase » (Grassmann et Dyckerhoff, 1928 *a*) ; dans le même temps était extraite du suc pancréatique une peptidase hydrolysant les peptides acylés mais exigeant un carboxyle libre, la carboxypeptidase (Waldschmidtleitz et Purr, 1929).

La classification initiale des exopeptidases repose en grande partie sur le travail de ces chercheurs.

Depuis, ont été encore identifiées, une aminopeptidase différente apparemment de l'aminopeptidase de Grassmann (Johnson, 1941), une carboxypeptidase (Félix et Labouesse-Mercouroff, 1956) et deux « protéinases » (Lenney, 1956).

— *La distribution subcellulaire* de ces enzymes n'a pas été précisée contrairement à celle de peptidases et protéinases de certains tissus animaux qui ont été trouvées (*a*) localisées essentiellement dans les fractions surnageante et microsomale d'une part et mitochondriale ou lyosomale d'autre part pour ce qui concerne respectivement les peptidases du foie (Rademacker et Soons, 1957 ; Patterson et *al.*, 1965), du rein (Matheson et *al.*, 1963), de la muqueuse intestinale (Robinson, 1963), de *Escherichia coli* (Matheson, 1963) la cathepsine A du foie (Rademacker et Soons, 1957 ; Weissmann et Dingle, 1961) et les protéinases acides et neutres du cerveau (Marks et Lajtha, 1963 ; Hooper, 1964) et (*b*) souvent *fermement associées* à l'acide ribonucléique qui les suit durant une grande partie de leur purification (Binkley, 1951 ; Patterson, 1957 ; Matheson et Hanes, 1959 ; Matheson et *al.*, 1963).

— *La fonction in vivo des peptidases* de la levure n'a pas été non plus élucidée : Leur rôle dans la digestion des aliments azotés de la levure est sans doute limitée, du fait de leur caractère endocellulaire, à la dégradation de ceux pouvant pénétrer dans la cellule et de ses réserves dans le cas de carences azotées des milieux de culture.

Post mortem, elles sont à l'origine de la dégradation jusqu'au stade aminoacide du matériel protéique et peptidique de la cellule (autolyse).

Des données expérimentales montrent qu'elles pourraient exercer aussi quelques fonctions essentielles en rapport avec la croissance : les variations cycliques des activités peptidasiques et protéinasiques de cultures de levures synchronisées avec la multiplication cellulaire, indiquent que des cycles de protéolyse augmentée forment l'essentiel des étapes précédant la division cellulaire (Sylven et *al.*, 1959).

Les travaux réalisés sur d'autres matériels cellulaires tels que la zone de croissance des racines d'orge (Bottelier et *al.*, 1941-43), coléoptile d'avoine (Avery et Linderstrom-Lang, 1938-41), tumeurs (Sylven et Malmgren, 1957), tissus néoplastiques des mammifères (Sylven et Bois, 1960), tissus cancéreux des plantes (Gainor et Crisley, 1961), queues de larves de *Xenopus* en voie de régénération (Jensen et *al.*, 1956), ont également appelé l'attention sur l'augmentation des activités peptidasiques et cathepsiques des cellules en croissance comparativement aux cellules plus différenciées ou normales.

La croissance fait appel à une synthèse et peut être aussi un renouvellement des protéines à partir du pool des acides aminés de la cellule dont une partie pourrait être fournie par la dégradation des protéines existantes ; les mécanismes reliant la synthèse protéique à la dégradation sont inconnus ; l'hypothèse a été avancée que les peptidases et les protéinases pourraient intervenir dans ces réactions cellulaires en dirigeant l'approvisionnement en acides aminés métaboliques nécessaires à la synthèse protéique.

Cette hypothèse repose sur le concept de « l'état dynamique des constituants du corps » (Schoenheimer, 1942).

Si ce concept d'un « état dynamique » des protéines a une signification physiologique générale au niveau cellulaire, le taux de dégradation doit être une fraction significative des taux de synthèse.

— Chez les organismes supérieurs une telle approche expérimentale est difficile de même que l'interprétation des données acquises en raison (*a*) de l'hétérogénéité et des conditions d'environnement du matériel étudié, (*b*) des différentes voies possibles de dégradation des protéines dans les tissus : dégradation intracellulaire, sécrétion, lyse cellulaire. Ainsi, nous n'avons pas de preuve concluante que les molécules protéiques dans les cellules des mammifères soient dans un état « dynamique » ; les taux de turnover mesurés pouvant exprimer l'état dynamique du tissu plutôt que l'état des molécules protéiques dans les cellules (Hogness et *al.*, 1955).

— Il en est autrement des cultures de microorganismes où des conditions homogènes peuvent être obtenues.

Des études réalisées sur *Escherichia coli* (Hogness et *al.*, 1955 ; Rotman et Spiegelman, 1954), la levure (Halvorson. 1958 *a*), durant *leur croissance* ont montré que (*a*) la synthèse induite de la β-galactosidase et des protéines de *E. coli* est un processus pratiquement irréversible, ces protéines ne subissent pas de dégradation et de renouvellement appréciable au cours de la croissance, (*b*) le taux de dégradation protéique et nucléique dans la cellule de *Saccharomyces cerevisiae* est assez petit pour être négligeable, les acides aminés et les nucléotides marqués sont convertis essentiellement *irréversiblement* en protéines et acides nucléiques.

Les protéines de ces microorganismes en croissance ne sont donc pas dans un état dynamique de renouvellement.

Mais les levures *non proliférantes*, en l'absence d'aliment azoté, sont au contraire le siège d'un turnover protéique et nucléique : leurs cellules (vivantes) sont le siège

d'une dégradation des acides nucléiques et des protéines de sorte que leurs pools d'acides aminés libres et de nucléotides restent approvisionnés ; ceux-ci peuvent être utilisés, quand de l'énergie exogène est fournie, à la synthèse des protéines et des acides nucléiques (Halvorson, 1958 *b*).

La situation est donc tout à fait différente selon que la cellule est en croissance ou au contraire non proliférante, soumise à des conditions de faim d'azote.

Finalement l'hypothèse émise plus haut sur la fonction *in vivo* des peptidases, trouve une justification partielle dans ces expériences de turnover protéique des microorganismes : dans les cellules non proliférantes, il y a bien un mécanisme pour l'approvisionnement interne du pool des acides aminés libres mais, dans les cellules proliférantes, l'augmentation des activités cathepsiques observées doit avoir une autre signification.

Les levures, microorganismes à croissance rapide et riches en activités peptidasiques et protéinasiques, seraient sans doute un matériel de choix pour l'étude des fonctions *in vivo*, encore mal connues des cathepsines.

Les « protéinases »

Nous désignons par protéinases, bien que ce terme soit incorrect, les enzymes de la levure doués d'activités vis-à-vis des protéines car aucune approche expérimentale de leur spécificité à l'aide de substrats synthétiques n'a été réalisée qui pourrait nous permettre de les classer parmi les endopeptidases.

Les autolysats de *Saccharomyces cerevisiae* sont capables de dégrader une partie des protéines qu'ils contiennent (Strain, 1933 ; Lenney, 1956) et d'hydrolyser divers substrats protéiques : gélatine, caséine, albumine... (Grassman et *al.*, 1926, 1928 *b*, 1930, 1931 ; Macrae, 1933 ; Reinartz et Hug, 1957), l'hémoglobine native (Hecht et Civin, 1936) ou dénaturée (Lenney, 1956). La levure renferme donc un matériel doué d'activités protéinasiques.

Nous ne savons rien sur sa spécificité endopeptidasique ; il convient cependant de remarquer que (*a*) ces « protéinases » se différencient des exopeptidases identifiées par la zone de pH, du côté acide, où elles sont actives et leur comportement vis-à-vis de certains effecteurs et (*b*) qu'une préparation protéinasique exempte d'activités poly et dipeptidasiques a été obtenue par autolyse fractionnée, adsorption sur alumine Cγ, élution par un tampon phosphate et précipitation par l'acétone (Grassmann et Dyckerhoff, 1928 *b*).

La technique utilisée par Grassmann et *al.*, (1926) pour mesurer ces activités, peu sensible et peu spécifique, enlève une partie de leur intérêt aux résultats qui concernent les propriétés du matériel protéinasique ainsi isolé, il n'en demeure pas moins vrai qu'ils ont solidement établi l'existence d'un système protéolytique différent de l'aminopeptidase et de la « dipeptidase ».

Les protéinases A et B.

Lenney (1956) a identifié, à partir de quatre souches différentes de *Saccharomyces cerevisiae*, deux protéinases (A et B) obtenues purifiées 10 à 20 fois par précipitation à l'éthanol.

La protéinase A est extrêmement labile dans les solutions d'urée, a un pH optimal de 3,7 vis-à-vis de l'hémoglobine dénaturée aux acides ; la protéinase B est

activée par l'urée, a un pH optimal de 6,2 vis-à-vis de l'hémoglobine dénaturée à l'urée ; contrairement à la protéinase A elle contient des groupes sulfhydryles essentiels : elle est inhibée réversiblement par le parachloromercuribenzoate qui reste sans effet sur la protéinase A.

La cystéine, le cyanure de potassium qui activent, et l'iodacétate qui inhibe la papaïne, sont sans effet sur ces enzymes.

Le matériel protéinasique isolé par Reinartz et Hug (1957) diffère aussi de la papaïne par sa stabilité aux agents oxydants, à l'acide iodacétique et par sa non activation par KCN et la cystéine.

L'existence des protéinases A et B a été confirmée par Sylven et *al.* (1959) dans des homogénéisats au désoxycholate de sodium de *Saccharomyces cerevisiae*. Ils ont montré en outre que ces deux protéinases n'hydrolysent pas ou très peu la N benzoyl-*l*-arginineamide. Elles présentent donc une spécificité différente de la trypsine.

D'un point de vue quantitatif, l'activité spécifique de la protéinase B dans les précipités alcooliques, est d'environ 5 p. 100 de celle de la trypsine cristallisée et la quantité d'enzyme obtenue à partir de 1 g de levure de boulangerie équivaut à 0,1 mg de trypsine (activités mesurées par la méthode de Anson (1938).

L'auto-activation des protéinases, est une propriété commune à toutes les activités protéinasiques de la levure décrites jusqu'ici et mérite qu'on s'y attarde un instant. Willstätter et Grassmann (1926) signalent que la maintien à 0°C et pH 7,0 pendant une semaine des autolysats de levure, multiplie par deux leurs activités protéinasiques. Les activités par ml des protéinases A et B, augmentent de 300 à 400 p. 100 quand les autolysats sont incubés une nuit à pH 5,0 et 25-30°C (Lenney, 1956).

Durant ce processus, ces protéinases digèrent 70 à 80 p. 100 des autres protéines de l'autolysat et leurs activités spécifiques augmentent de 10 à 20 fois. A pH 4,3 la protéinase B peut être activée indépendamment de A. Le taux d'activation de B est augmenté considérablement par l'urée concentrée (3 mol) à pH 5,0 ou par le calcium.

Différentes explications peuvent être données de cette auto-activation qui mériteraient une vérification expérimentale :

— L'intervention d'un activateur a été avancée ; ce serait le glutathion (Grassmann et *al.*, 1931) ou la cystéine, mais la cystéine n'active pas la protéinase B.

— La présence d'un précurseur inactif est fortement suggérée par les effets du calcium et de l'urée sur l'activation de la protéinase B que l'on ne peut s'empêcher de rapprocher du rôle de ces composés respectivement dans la conversion du trypsinogène en trypsine (McDonald et Kunitz, 1941) et de la protyrosinase en tyrosinase (Bodine et Allen, 1938).

Dans ce cas l'action de l'urée pourrait s'expliquer par une dénaturation partielle du précurseur inactif de la protéinase B qui favoriserait sa transformation en enzyme actif. L'activation différentielle des protéinases A et B laisserait prévoir la possibilité de plusieurs précurseurs. L'existence de précurseurs inactifs parmi les protéases des microorganismes ne serait d'ailleurs pas un fait nouveau ; une protéase et son précurseur inactif, activés par la trypsine ou autocatalytiquement en présence de cystéine, ont été en effet obtenus cristallisés à partir de filtrats de culture de *Streptococcus haemolyticus* A (Elliot, 1950). La protéinase de *Coccus* P est libérée dans le mlieu

sous forme inactive et, comme la précédente, est activée par autocatalyse (Gorini et Lanzavecchia, 1954).

— La présence de zymogène dans les extraits protéolytiques de levure n'exclurait pas bien entendu, la possibilité de la présence d'inhibiteurs de ces enzymes ou des enzymes activants, inhibiteurs qu'on leur trouve très souvent associés ; l'action activante de l'urée sur la protéinase B pourrait alors s'expliquer aussi par la dénaturation d'un inhibiteur.

En résumé *Saccharomyces cerevisiae* renferme vraisemblablement plusieurs « protéinases » dont il serait intéressant de préciser la spécificité et d'éclaircir les mécanismes d'activation qu'il serait d'ailleurs indispensable de contrôler pour une estimation quantitative de ces enzymes.

L'endopeptidase

Recemment Mlles Félix et Brouillet (1966), ont isolé, à partir de levures de brasserie, une peptidase présentant les caractères d'une endopeptidase.

Elle hydrolyse les CBZ-dipeptides dont le groupe carboxyle du résidu C terminal a été amidé. Cependant sa spécificité sur de longs polypeptides ou des protéines n'a pas été étudiée. On sait seulement qu'elle hydrolyse préférentiellement les liaisons peptidiques faisant intervenir des résidus d'acides aminés aromatiques ou aliphatiques à longue chaine.

Elle présente une activité maximale au voisinage de pH 6,0 ; elle n'est pas inhibée par les complexants des métaux mais par les réactifs du groupe SH.

L'enzyme peut être complètement inhibé par le DFP (Félix et Brouillet, 1966).

Les exopeptidases

Les peptidases de la levure groupées dans ce chapitre, ont leur spécificité bien établie du point de vue de leur exigence pour un groupe polaire libre adjacent à la liaison peptidique sensible : un α-COOH (carboxypeptidase), un α-NH_2 (amino-peptidase) ou les deux (amino-carboxypeptidases).

La carboxypeptidase.

Mlles Félix et Labouesse-Mercouroff (1956) ont mis en évidence l'activité carboxypeptidasique de *Saccharomyces cerevisiae* de différentes origines technologiques. La teneur des levures en carboxypeptidase est variable selon leur origine ; en général, les levures basses de brasserie sont plus riches en l'enzyme que les levures de boulangerie.

Par précipitations fractionnées au sulfate d'ammonium, et à l'alcool éthylique suivies d'une chromatographie sur DEAE-cellulose, Mlles Félix et Brouillet (1960) ont obtenu une solution enzymatique 200 fois plus riche que l'autolysat de départ.

Plus récemment, ces mêmes auteurs (1966) ont obtenu l'enzyme purifié 400 fois par des chromatographies successives sur DEAE-cellulose et Sephadex G 200.

Le pH optimal de l'enzyme se situe vers pH 6,0 ; il est instable en dehors de limites étroites de pH 4,7 à 6,5, est inhibé par l'EDTA et l'orthophénantroline, l'acétate mercurique mais non par le diisopropylfluorophosphate.

Il peut être également inhibé par les métaux lourds (Hg, Ag), par les réactifs du groupe SH, (PCMB et iodacétate), mais cette dernière inhibition ne peut être supprimée par addition de cystéine ou de β-mercaptoéthanol (Félix et Brouillet, 1966).

Sa spécificité a été étudiée en utilisant comme substrat soit des dipeptides N substitués, soit des polypeptides naturels de structure connue, chaîne B de l'insuline, ACTH, peptides résultant de l'hydrolyse trypsique du lyzsoyme. Elle est très large car l'enzyme libère, à partir de l'extrémité C terminale, la plupart des acides aminés y compris la proline, le glycocolle, les acides aminés basiques ou dicarboxyliques qui sont résistants à l'action de l'une ou l'autre des carboxypeptidases A et B du pancréas.

Parmi les substrats testés, un des plus sensibles est la carbobenzoxyglycyl-*l*-leucine.

La libération de la proline par la carboxypeptidase de la levure est particulièrement intéressante à souligner en raison de l'incapacité de la carboxypeptidase A à hydrolyser les liaisons peptidiques comprenant cet acide aminé en position C terminale. Cet enzyme pourrait donc fournir un outil de travail intéressant pour la dégradation des protéines qui ne seraient pas attaquées par la carboxypeptidase pancréatique.

Les aminopeptidases.

Deux préparations peptidasiques à spécificité aminopeptidasique ont été isolées de *Saccharomyces cerevisiae* (Grassmann et *al.*, 1928 *a* et *b*, 1934) et (Johnson, 1941) dont l'individualité n'a pas été démontrée. Nous les présenterons cependant séparément sans pour cela admettre qu'il s'agit de deux enzymes distincts.

L'aminopeptidase de Grassmann. — Ce matériel correspond à des préparations assez sommairement purifiées, mais débarrassées de la « dipeptidase » et de l'essentiel de la protéinase, par précipitation à pH 4,5 d'extraits chloroformiques obtenus par autolyse fractionnée en présence de papaïne, suivie d'une dialyse, d'une précipitation acétonique et d'une élimination partielle des impuretés nucléiques abondantes dans les extraits bruts (Grassmann et *al.*, 1928 *a*, *b* et 1934). Les activités étaient mesurées par titration à la potasse alcoolique des groupes aminés libérés (Grassmann et Heyde, 1929).

Sa spécificité a été étudiée sur nombre de di, tri et polypeptides ainsi que sur des peptides N et C substitués et des protéines. Il n'hydrolyse pas les peptides acylés et libère l'acide aminé N terminal des peptides hydrolysés. Il est capable d'attaquer les substrats les plus simples tels que les amino-acides amides aussi bien que les peptides à huit résidus d'acides aminés et les peptones mais non les dipeptides.

Cette résistance à l'hydrolyse des dipeptides, à la différence de leurs amides correspondantes, suggère l'action inhibitrice du groupe α carboxylique libre. La nature du résidu N terminal exerce une influence notable sur son activité : l'alanyldiglycine est hydrolysée deux fois plus rapidement que la leucyldiglycine, quatre à cinq fois plus rapidement que la triglycine, et la prolyldiglycine n'est pas hydrolysée (Grassmann et *al.*, 1927 et 1929). Il est inhibé par SH_2 et le pyrophosphate de sodium (Grassmann et Dyckerhoff, 1928 *b*).

Les préparations purifiées hydrolysent la leucylglycine cinq cents fois plus lentement que la leucyl-diglycine mais elles acquièrent une activité LG en présence d'ions Cl^- ou d'extraits bouillis de levure (Grassmann et *al.*, 1938 ; Schneider et

Graff, 1940). Cette acquisition d'activités dipeptidasiques a donné lieu à l'interprétation qu'une « dipeptidase synthétique » pouvait être obtenue par addition d'un cofacteur à une matrice protéique (Schneider et Graff, 1940). Plus simplement elle peut être l'indice d'une contamination par une dipeptidase à moins qu'il n'y ait eu induction d'un changement de spécificité par addition d'un métal introduit par les extraits bouillis ainsi que l'hypothèse a été avancée pour la leucine-aminopeptidase (Vescia, 1956).

L'aminopeptidase de Johnson. — Johnson (1941) a confirmé la présence d'un matériel aminopeptidasique dans la levure en isolant un enzyme sans action sur la N-méthylleucylglycylglycine mais hydrolysant la leucineamide. Les activités peptidasiques étaient mesurées, par titration des carboxyles libérés à l'acide chlorhydrique, en milieu acétonique (Linderstrom-Lang, 1927). Il a été obtenu purifié 800 fois à partir d'extrait autolytique par une série de précipitations fractionnées à l'acétone et se comporte comme une protéine homogène à l'ultracentrifugation et à l'électrophorèse.

Mais sa spécificité a été étudiée sur seulement un petit nombre de di et tripeptides, de sorte qu'on n'en connaît pas grand-chose : il hydrolyse à la fois les di et polypeptides mais les premiers plus lentement et présente une affinité plus grande pour les leucylpeptides que pour les alanyl et glycylpeptides ; la prolyldiglycine n'est pas attaquée ou très peu.

L'enzyme possède une stéréospécificité *l* ; il est activable par Cl^- et Zn^{++} mais non par Mn^{++} et Mg^{++} (Johnson et Berger, 1939).

En résumé deux matériels aminopeptidasiques ont été isolés de *Saccharomyces cerevisiae* ; celui de Grassmann présenterait une spécificité originale, intéressante si elle était vérifiée. Elle tient apparemment à la fois de celles de la leucine-aminopeptidase (Smith et Spackmann, 1955) (hydrolyse des amino-acides amides) et de la tripeptidase (Fruton et *al.*, 1948 ; Adams et *al.*, 1952) (non attaque des dipeptides). Celui de Johnson ressemble au contraire tout à fait aux leucine-aminopeptidases largement répandues chez les microorganismes (Berger et *al.*, 1938), par son activation par les métaux et son affinité à la fois pour les di- et polypeptides. Cependant en l'absence d'autres éléments d'informations on peut se demander si les deux aminopeptidases de *Saccharomyces cerevisiae* ne sont pas en fait le même enzyme comme pourrait le laisser supposer leur activation dipeptidasique commune par les ions Cl^-.

La (les) amino-carboxypeptidase(s).

Un matériel peptidasique qui n'hydrolysait que les dipeptides, et nommé pour cette raison « dipeptidase », a été extrait de *Saccharomyces cerevisiae* (Grassmann et Klenk, 1930).

Son isolement de la « protéinase » et de l'aminopeptidase a été réalisé par traitements des autolysats à l'alumine C γ et précipitation acétonique (Grassmann et Klenk. 1930) ou plus simplement par précipitation fractionnée à l'acétone d'extraits de Lebedew (Schneider et Graaf, 1940).

Plus récemment Nishi (1958) a purifié un matériel dipeptidasique de la levure, 25 fois vis-à-vis de l'activité GG mesuré en présence de cobalt, mais sa spécificité amino-carboxypeptidasique n'a pas été vérifiée.

La spécificité amino-carboxypeptidasique a été établie à partir de l'enzyme de la levure préparée selon le procédé de GRASSMANN et KLENK. L'amino-carboxypeptidase hydrolyse les dipeptides correspondant à la structure générale

Les hydrogènes α et α' (BERGMANN et *al.*, 1935), l'hydrogène peptidique (BERGMANN, 1932), la configuration *l* des acides aminés constitutifs du substrat (BERGMANN et *al.*, 1935) ont une action déterminante sur sa senbilité à l'hydrolyse ; les chaînes latérales du dipeptide (radicaux R et R') (GRASSMANN, 1927 ; GRASSMANN et *al.*, 1929) influent sur sa vitesse d'hydrolyse.

Mais la caractéristique essentielle de la spécificité amino-carboxypeptidasique est la nécessité de la présence dans le substrat de groupes aminé et carboxylique libres, adjacents à la liaison peptidique (GRASSMANN et DYCKERHOFF, 1928 *a* ; BERGMANN et *al.*, 1935) ce qui exclut l'attaque des polypeptides et des protéines par l'amino-carboxypeptidase (GRASSMANN, 1927).

Le matériel à spécificité amino-carboxypeptidasique de la levure isolé par GRASSMANN, hydrolyse un grand nombre de dipeptides. Les plus rapidement attaqués sont l'alanylglycine et la glycylleucine ; la glycylglycine l'est très lentement (GRASSMANN, 1927) et la prolylglycine pas du tout (GRASMANN et *al.*, 1929).

La résistance à l'hydrolyse, par l'amino-carboxypeptidase et l'aminopeptidase, des peptides dans lesquels la proline participe à la liaison peptidique est un bon exemple de l'influence des chaînes latérales du substrat sur l'activité des peptidases. Nous verrons plus loin que le noyau hétérocyclique pyrrol, comme d'ailleurs l'iminazol de l'histidine, paraît exiger une spécificité étroite.

— Les *propriétés* de ce matériel dipeptidasique sont mal connues. Les résultats des recherches effectuées, anciennes pour la plupart, sont quelque peu embrouillés et incertains en raison du choix parfois de la leucylglycine comme substrat et du manque de pureté des extraits étudiés. Parmi ces propriétés deux sont cependant intéressantes à signaler car elles font apparaître l'importance des métaux dans l'activité de l'amino-carboxypeptidase. Il s'agit (*a*) de son inhibition par les complexants métalliques, (*b*) de son activation différentielle par les métaux :

— Il est inhibé par SH_2, la cystéine, le pyrophosphate (GRASSMANN et DYCKERHOFF, 1933 ; GRASSMANN et *al.*, 1930), SNa_2, le diéthyldithiocarbamate, le versène, l'hydroxyquinoléine (SCHALES et ROUX, 1950). Il est aussi inactivé par précipitation au sulfate d'ammonium (GRASSMANN et *al.*, 1938) ou par dialyse (SHALES et ROUX, 1950) (BERGER et JOHNSON, 1940) et retrouve son activité par addition de différents extraits bouillis de levure (GRASSMANN et *al.*, 1938) (SCHALES et ROUX, 1950) ou d'ions métalliques (BERGER et JOHNSON, 1940). Un métal paraît donc nécessaire à son activité et il semblerait qu'il lui soit faiblement associé.

— Le manganèse et le cobalt, activent spécifiquement l'hydrolyse de la glycylglycine (JOHNSON et BERGER, 1939 ; MASCHMANN, 1943 *a* ; NISHI, 1958) alors qu'ils sont sans effet ou inhibiteurs de l'hydrolyse de la leucylglycine (MASCHMANN, 1943 *a*) et de l'alanylglycine (BERGER et JOHNSON, 1940).

Le fer et le manganèse avec ou sans cystéine, activent l'hydrolyse de la *d*-LG

(Schales et Roux, 1950 ; Berger et Johnson, 1940 ; Maschmann, 1943 *a*). Cette activation se rencontre aussi dans différents extraits autres que la levure (Berger et Johnson, 1940 ; Berger et *al.*, 1941 ; Smith et Bergmann, 1944) et mérite d'être signalée étant donné la stéréospécificité étroite des enzymes protéolytiques pour les substrats de configuration *l*.

On a vu dans les faits observés d'activation différentielle de certaines activités dipeptidasiques, un argument sérieux pour admettre l'existence de plusieurs amino-carboxypeptidases dans la levure : une « leucylglycine-dipeptidase » (Maschmann, 1943 *a*), une « glycylglycine-dipeptidase » (Johnson et Berger, 1942 ; Maschmann, 1943), à côté d'une « dipeptidase » polyvalente inhibée par les mêmes métaux.

Nishi (1958) semble admettre implicitement l'existence d'une amino-carboxypeptidase spécifique en nommant « glycylglycine-dipeptidase », le matériel dipeptidasique de la levure qu'il a purifié vis-à-vis de l'activité GG mesurée en présence de cobalt.

Cependant ces activités n'ont pas été séparées ni étudiées par rapport à d'autres activités dipeptidasiques de sorte que l'existence d'amino-carboxypeptidases spécifiques n'a pas été prouvée.

On pourrait se demander aussi si les métaux ne peuvent pas modifier la spécificité des peptidases comme le laisserait supposer les changements de la spécificité de la carboxypeptidase A induits par le remplacement sur l'apoenzyme du Zinc par d'autres métaux (Coleman et Vallee, 1960).

En résumé on ne sait pas si *Saccharomyces cerevisiae* renferme une ou plusieurs amino-carboxypeptidases. Un problème intéressant de spécificité reliée aux métaux est posé par son matériel dipeptidasique. Nous le discuterons après avoir situé ce matériel par rapport aux amino-carboxypeptidases animales pour certaines des quelles ce problème a été aussi posé dans les mêmes termes.

II — Les amino-carboxypeptidases d'origine animale

Les extraits d'organes ou de tissus animaux sont capables, comme la levure, d'hydrolyser nombre de dipeptides. Ces activités dipeptidasiques sont largement distribuées avec les autres activités exopeptidasiques dans le *muscle*, le *cœur*, l'*utérus* (Smith, 1948 *a*, *b*, *c*), le *cerveau* (Pope et Anginsen, 1948 ; Ansell et Richter, 1954 ; Uzman et *al.*, 1960), le *foie* (Rademacker et Soons, 1957 ; Wilcox et Fried, 1963 ; Patterson et *al.*, 1965), les *érythrocytes* (Adams et *al.*, 1952 *a*, *b* ; Salvidio, 1953 ; Ayavon et Cristol, 1963), la *muqueuse intestinale* (Berger et Johnson, 1940 ; Gailey et Johnson, 1941 ; Smith et Bergmann, 1944 ; Smith et Polglase, 1949 ; Robinson et Schaw, 1960), le *rein* (Hanson et Smith, 1949 ; Davis et Smith, 1953, 1957 ; Smith et Spackmann, 1955 ; Robinson et Birnbaum, 1953).

Leur étude comparative dans des homogénats de différents tissus de rat a montré qu'elles sont plus abondantes dans le rein, la rate, le foie que le cerveau puis le muscle (Marks et Lajtha, 1963). Leur fonction intracellulaire est inconnue mais leur concentration élevée dans les cellules en voie de division ou les organes à haute activité biologique ou turnover protéique rapide (A. Tarver, 1954), montrent qu'elles jouent un rôle métabolique important et laissent supposer leur participation dans les processus cellulaires fondamentaux. Cependant en dépit de la large distribution de ces

activités dipeptidasiques, de leur abondance dans certains organes et de l'intérêt que représente l'étude de leur signification biologique, la connaissance que nous avons des amino-carboxypeptidases animales est limitée.

C'est qu'en effet la plupart des travaux qui s'y rapportent ont été réalisés sur des extraits bruts ou imparfaitement purifiés sans doute en raison des difficultés que présente leur isolement du fait de (*a*) *leur instabilité* (Gailey et Johnson, 1941 ; Smith et Polglase, 1949 ; Davis et Smith, 1953 ; Patterson et *al.*, 1965), (*b*) *leur dilution dans des milieux peptidasiques complexes* : la muqueuse intestinale et le rein comprennent un matériel dipeptidasique varié à côté de différentes aminopeptidases ; les protéines solubles du foie de rat ont été résolues, par électrophorèse de zone, en plus de dix fractions peptidasiques parmi lesquelles, quatre sont représentées par des activités dipeptidasiques non identifiées, deux, par des activités imino et imidodipeptidasiques et une, la plus importante quantitativement, par des activités leucine-aminopeptidasiques (Patterson et *al.*, 1965), (*c*) *l'absence de substrat spécifique.*

Les amino-carboxypepetidases animales en effet, comme celles de la levure également, ne sont pas les seuls enzymes responsables des activités dipeptidasiques : une aminopeptidase qui hydrolyse les dipeptides plus rapidement que les tripeptides correspondants, a été purifiée six cents fois à partir du rein de chien (Robinson et *al.*, 1953) ; Linderstrom-Lang, (1929), a depuis longtemps démontré l'activité dipeptidasique LG de la leucyl-peptidase de la muqueuse intestinale. La leucine-aminopeptidase du rein de porc, purifiée mille fois par Smith et Spacknanns (1955), hydrolyse les leucyl N ou C dipeptides presque aussi rapidement que la leucineamide ; une leucine-aminopeptidase est responsable d'une partie des activités dipeptidasiques du foie de rat (Patterson et *al.*, 1965).

Il est donc difficile d'établir la part qui revient aux amino-carboxypeptidases dans les activités dipeptidasiques d'extraits bruts ou imparfaitement purifiés. C'est la raison pour laquelle, dans les travaux réalisés, règne parfois une certaine confusion sur la spécificité des activités décrites comme ayant pour origine les amino-carboxypeptidases.

Ainsi récemment, la préparation d'une « dipeptidase » hautement purifiée à partir du rein de porc a été décrite sur la seule base de l'hydrolyse de la glycylleucine (Vescia et Traniello, 1962) qui est pourtant hydrolysée, nous venons de le voir, par la leucine-aminopeptidase particulièrement abondante dans cet organe. De même les activités AG et LG ont été attribuées dans le sang à une « AG-dipeptidase » et une « LG-dipeptidase » sans que leur spécificité dipeptidasique ait été établie (Ayavon et Cristol, 1963).

Ainsi donc, comme nous allons le voir, les tentatives de purification ont été peu nombreuses et leurs résultats le plus souvent limités ou bien la spécificité d'enzymes décrits comme « dipeptidases » n'a pas toujours été clairement démontrée.

1. *Enzymes à spécificité étroite : la prolidase et la prolinase*

C'est à partir de la glycyl-*l*-proline et de la prolylglycine que Davis et Smith ont isolé du rein de porc deux enzymes de spécificité étroite et dont la spécificité amino-carboxypeptidasique a été démontrée à partir d'acyl-dipeptides et de dipeptide-amides.

— Le premier, l'*imidodipeptidase ou prolidase*, purifié 1 200 fois, hydrolyse spécifiquement les dipeptides dans lesquels l'azote de la proline ou de l'hydroxyproline est engagé dans la liaison peptidique, (l'hydrogène peptidique n'est donc pas nécessaire à son activité.) Il exige spécifiquement le manganèse pour son activité ; l'activation est fonction du temps d'incubation de l'enzyme avec le métal (Smith, 1948 *d*), il est inhibé par Fe, Co, Ni, Cu, Zn, Cd, Hg, Ag, Pb, par les complexants des métaux et par les réactifs des groupes thiols, pH optimal 8,0 (Davis et Smith, 1957).

— Le second, l'*iminodipeptidase ou prolinase*, très labile, paraît bien avoir son activité restreinte aux dipeptides qui possèdent le groupe imino libre de la proline ou de l'hydroxyproline, mais il a été purifié 30 fois seulement ; il est activé par le manganèse, pH optimal 8,0 (Davis et Smith, 1953).

L'amino-carboxypeptidase de la levure isolée par Grassmann, n'hydrolysait pas ces substrats mais l'existence d'un enzyme hydrolysant la prolylglycine dans les extraits bruts de levure a été démontrée (Grassmann et *al.*, 1929 ; Berger et Johnson, 1940).

— La *carnosinase* activée par Mn^{++} et Zn^{++}, inhibée par les complexants des métaux est une peptidase de spécificité étroite qui hydrolyse préférentiellement les dipeptides dans lesquels l'azote de l'histidine est engagée dans la liaison peptidique (Hanson et Smith, 1949). Celle-ci est habituellement considérée comme une « amino-carboxypeptidase » ; elle exige bien un groupe aminé libre mais le blocage du carboxyle libre ralentit seulement son activité, elle est donc à classer plutôt parmi les aminopeptidases.

2. *Enzymes à spécificité large*

A côté de ces enzymes à spécificité étroite, d'autres paraissent avoir une spécificité plus étendue : 1950 ;

— La *cystéinylglycinase* (Olson et Binkley, 1950 ; Binkley, 1952), purifiée à partir du rein de porc (Semenza, 1957), est activable par Mn, Fe et Co et hydrolyse la cystéinylglycine ainsi qu'un certain nombre de dipeptides dont la glycylcystéine, la leucylglycine et la glycylglycine ; son pH optimal est voisin de 8,0. Sa spécificité amino-carboxypeptidasique n'a cependant pas été clairement démontrée.

— La *glycyltyrosinase* isolée de la glande thyroïde de bœuf et purifiée 60 fois, inhibée par les complexants des métaux et dont l'activité est restaurée par Zn et Mn, hydrolyse un grand nombre de dipeptides à l'exception de la glycylglycine, de la prolylglycine et de la glycylproline ; sa spécificité amino-carboxypeptidasique n'a pas été établie mais elle est exempte d'activité protéinasique, testée vis-à-vis de l'hémoglobine, et vis-à-vis de la tyroglobuline, hydrolysée par une protéinase présente dans la thyroïde ; elle est exempte aussi de leucine-aminopeptidase puisqu'elle n'hydrolyse pas la leucineamide (Loughlin et Trikojus, 1964).

3. *Enzymes hypothétiques*

A l'exception de ces enzymes, c'est le plus souvent par des techniques indirectes faisant appel au traitement thermique des extraits enzymatiques bruts ou à l'action sur ceux-ci des métaux, qu'a été établi ou plutôt avancé l'existence de différentes amino-carboxypeptidases.

— C'est le cas des d-*dipeptidases* dont l'existence a été avancée sur la base de l'activation de l'hydrolyse des *d*-dipeptides par différents métaux : par addition de Mn + cystéine, la muqueuse intestinale de chien acquiert une activité *d*-leucylglycine appréciable (Berger et Johnson, 1940) et les extraits de rein de cobaye une activité *d*-glycylalanine (Maschmann, 1943-*b*). L'activité *l*-glycylalanine étant inhibée dans les mêmes conditions, Maschmann conclue que les deux isomères sont hydrolysés par des enzymes différents.

Zn et Co inhibent l'activité *l*-glycylalanine et active celle de la *d*-glycylalanine des extraits de différents tissus de rat (Price et *al.*, 1949).

Aucune « *d*-dipeptidase » n'a cependant été isolée. Il a seulement été montré (*a*) que la purification de la leucine-aminopeptidase de la muqueuse intestinale entraînait des variations significatives du rapport *d*-LG/*l*-LG indiquant que l'enzyme qui agit sur *d*-LG est distinct de la leucine-aminopeptidase (Smith et Bergmann, 1944) et (*b*) que les activités *d*-glycylalanine et *l*-glycylalanine n'avaient pas la même distribution subcellulaire dans les homogénats de tissus de rat (Price et *al.*, 1949).

— *L'alanylglycine-dipeptidase* — Dans les extraits bruts d'aminopeptidase de la muqueuse intestinale du chien, une amino-carboxypeptidase serait responsable de l'hydrolyse de l'alanylglycine, différente de l'aminopeptidase parce que très labile, pas activée par Mn et Mg, différente aussi des amino-carboxypeptidases hydrolysant la glycylglycine, la glycylleucine ou la prolylglycine activées respectivement par Co (Smith, 1948 *a* ; Gailey et Johnson, 1941) par Mn ou Zn (Smith, 1948 *b*) ou par Mn (Gailey et Johnson, 1941). Elle est inhibée par les complexants des métaux.

L'activité AG est largement répandue dans les tissus animaux ; quantitativement c'est une des activités dipeptidasiques les plus abondantes de la muqueuse intestinale, elle est remarquable par son instabilité.

— Dans différents tissus (muscle de rat, utérus humain), l'hydrolyse de la glycylleucine et de la glycylglycine serait le fait de deux enzymes distincts : une *glycylleucine-dipeptidase* spécifiquement activée par Zn^{++} dans l'utérus humain, par Mn^{++} dans le muscle de rat, et inhibée par Co^{++} (Smith, 1948 *b*) et une *glycylglycine dipeptidase* spécifiquement activée par Co^{++} (Smith, 1948 *a*).

La spécificité amino-carboxypeptidasique de ces deux matériels a été établie à l'aide de substrats convenablement substitués sur des préparations sommairement purifiées par précipitation fractionnée des extraits bruts de muscle de rat au sulfate d'ammonium pour la glycylleucine-dipeptidase (Smith, 1948 *b*) et à l'acétone pour la glycylglycine dipeptidase (Smith, 1948 *a*). Mais nous ne savons rien de leur spécificité vis-à-vis d'autres dipeptides de sorte que leur individualité n'a pas été démontrée bien que les termes de « glycylleucine-dipeptidase » et de « glycylglycine dipeptidase » adoptés pour les désigner dans les ouvrages spécialisés, laissent supposer une spécificité restreinte à ces substrats.

La *glycylglycine-dipeptidase* offre cependant un intérêt particulier car elle représente l'exemple type d'un enzyme dont la spécificité étroite a été admise par les différents chercheurs qui s'y sont intéressés sur essentiellement le critère de son activation spécifique par le cobalt. De plus cette activité est largement distribuée dans les matériels biologiques les plus divers : *épinard, choux, malt, bactéries* (Johnson et Berger, 1939), *levure, Aspergillus oryzae* (Crewther et Lennox, 1953), *muqueuse intestinale* (Gailey et Johnson, 1941 ; Robinson et Schaw, 1960), *foie* (Wilocx

et Fried, 1963), *cerveau* (Uzman et *al.*, 1960), *érythrocytes* (Adams et *al.*, 1952), *cæcum pylorique* des poissons (Togasawa et Katsumata, 1957) dans lesquels elle n'apparaît parallèle, du point de vue activation par les métaux, à aucune autre des activités dipeptidasiques qui lui ont été comparées.

La *spécificité* étroite de la « GG-dipeptidase » s'expliquerait par l'affinité du cobalt, beaucoup plus grande pour la glycylglycine, au pH optimal de l'enzyme, que pour les autres substrats testés ; ainsi la sarcosylglycine, susceptible de former également dans les mêmes conditions, un complexe avec Co^{++}, est hydrolysée par la « GG dipeptidase » (Smith, 1948 *c*).

La part qui revient à la protéine enzymatique reste à préciser dans cette hypothèse étant donné que cette activité, comme dans le cas de la levure, n'a pas été séparée ni étudiée par rapport à d'autres activités dipeptidasiques.

Il a été seulement signalé que l'activité GG, le plus souvent faible dans les extraits bruts, subit, comme dans le cas de la levure, une augmentation significative par rapport aux activités dipeptidasiques LG et AG, au cours de l'isolement de la fraction dipeptidasique de ces extraits bruts (Smith, 1948 *a* ; Gailey et Johnson, 1941) comme s'il y avait eu amorce de séparation des enzymes ou bien élimination d'un inhibiteur.

Nous connaissons peu de choses également de ses propriétés. Le matériel dipeptidasique des extraits glycérolés de cæcum pylorique de poissons a cependant été purifié 20 fois environ vis-à-vis de la seule glycylglycine par adsorption sur hydroxyde ferrique et élution par un tampon phosphate (Togasawa et Katsumata, 1957) et sa spécificité amino-carboxypeptidasique démontrée (Togasawa et Katsumata, 1958). Il est activé par Co^{++} et à un degré moindre Mn^{++} et Mg^{++} ; il est inhibé par (*a*) Zn^{++}, Pb^{++}, Cd^{++}, Ag^{++} ; (*b*) les réactifs des métaux lourds H_2S, HCN ; (*c*) les réactifs des groupes thiols : l'acide monoiodacétique et le parachloromercuribenzoate (PCMB), (Togasawa, 1957). Son pH optimal se situe aux environs de 7,5. En tous ces points il ressemble au matériel dipeptidasique de la levure purifié par Nishi 15 fois vis-à-vis de la glycylglycine.

En résumé, comme la levure, les extraits biologiques d'origines les plus diverses, sont doués d'activités dipeptidasiques dont une part revient à des enzymes spécifiques de l'hydrolyse de dipeptides.

Nous connaissons peu de chose de ces amino-carboxypeptidases mais il est cependant possible de dégager des travaux dont nous avons essayé de retenir l'essentiel, celles de leurs caractéristiques qui paraissent les plus intéressantes :

Spécificité. — Deux au moins ont une spécificité étroite reliée aux chaînes latérales adjacentes à la liaison peptidique attaquée. Leur spécificité est liée, comme celle de toutes les amino-carboxypeptidases, à la présence de groupes α-COOH et α-NH_2 libres mais aussi à des détails structuraux du substrat. Elles ont la haute spécificité structurelle que l'on rencontre chez les endopeptidases. Dans la classification des enzymes protéolytiques elles font donc le lien entre les exo- et les endopeptidases.

Instabilité. — Elles sont pour la plupart plus fragiles (sensibilité à la chaleur, à la lyophilisation) que les aminopeptidases, ce qui rend difficile leur isolement ; elles sont cependant plus stables en présence de glycérol (Gailey et Johnson. 1941) ou de sucrose (Patterson, communication personnelle).

Inhibition par les réactifs des groupes thiols et par les complexants des métaux. — Tout au moins pour celles qui ont été testées vis-à-vis de ces réactifs.

Action des métaux. — Suivant l'espèce du métal ajouté, certaines activités sont inhibées, d'autres au contraire activées. L'activation par les métaux de l'hydrolyse des *d*-dipeptides est particulièrement intéressante à souligner étant donné la *l*-stéréospécificité étroite des peptidases.

Les amino-carboxypeptidases se situent parmi les peptidases nombreuses activables par les métaux et posent avec elles le problème de la fonction des métaux dans l'activité peptidasique. Quelle signification donner à cette action des métaux ? Ce que nous savons d'elles ne nous permet pas de répondre mais mérite d'être discuté à partir des connaissances acquises sur les métalloenzymes.

III — Discussion de l'action des métaux sur l'activité des amino-carboxypeptidases

Les faits observés d'inhibition par les complexants, d'inhibition ou d'activation par les métaux, l'importance accordée aux activations différentielles par les métaux comme critère de différenciation des amino-carboxypeptidases, nous amènent à poser les trois questions suivantes : 1. *métal et activité* : un métal est-il nécessaire à leur activité ? 2. *métal, test de différenciation* : ce critère est-il valable pour admettre l'individualité d'amino-carboxypeptidases ? 3. *métal et spécificité* : quel rôle le métal joue-t-il dans leur activité et leur spécificité ?

1. *Métal et activité*

La première question à poser est la suivante : un métal est-il nécessaire à l'activité des amino-carboxypeptidases ?

On distinguait autrefois parmi les peptidases celles qui étaient activables par les métaux, de celles qui ne l'étaient pas. Il en était déduit que les premières nécessitaient un métal pour leur activité. Mais, parmi les non activables par les métaux, certaines sont inhibées par les complexants métalliques (l'amino-carboxypeptidase de la levure isolée par Grassmann).

Ce critère d'activation par les métaux est donc tout à fait insuffisant pour se rendre compte si l'activité d'une amino-carboxypeptidase est conditionnée par la présence d'un cofacteur métallique, pour se rendre compte en d'autres termes si elles font partie des métallopeptidases. On sait d'ailleurs que parmi celles-ci, certaines sont inhibées par les métaux soit qu'ils bloquent un groupe thiol actif (si c'est un thioenzyme) soit qu'ils déplacent un métal plus actif qu'eux (inhibition compétitive).

Beaucoup plus significative que ce vague concept d'activation par les métaux, est l'inhibition de la plupart des amino-carboxypeptidases par les complexants des métaux. Mais il ne peut être accepté *a priori* que cette inibition est le résultat d'une interaction avec un métal et les informations que nous en avons ne nous permettent pas de dire qu'elle est bien la conséquence d'une coordination de l'agent complexant avec le métal de l'enzyme.

La nécessité pour les amino-carboxypeptidases d'un cofacteur métallique, si elle est probable, reste donc cependant à prouver.

Selon VALLEE (1955), on peut classer les métallopeptidases suivant la force de liaison du métal avec la protéine enzymatique (*a*) en *metalloenzymes* à métal fortement lié qui suit la protéine au cours de sa purification durant laquelle le rapport métal/protéine augmente en même temps que l'activité spécifique et tend à devenir constant en fin de purification. L'enzyme hautement purifié peut donc être isolé avec son métal *in situ* et avec sa pleine activité. La carboxypeptidase pancréatique est un métalloenzyme contenant un atome de zinc par molécule (VALLEE et NEURATH, 1954).

L'addition du métal lié ou d'autres métaux à l'enzyme purifié peut s'accompagner d'une augmentation, d'une égalité ou d'une perte d'activité, (*b*) en *complexes métal-enzymes* dont la protéine peut être associée à différents ions métalliques suivant une combinaison facilement dissociable. Une simple dilution de la leucine aminopeptidase conduit à la dissociation du complexe qu'elle forme avec Mn (SMITH, 1946). L'apoenzyme peut être facilement obtenu libre de métal, par dialyse par exemple. L'élimination complète du métal peut ne pas entraîner une inhibition complète de l'activité, il n'y a pas proportionnalité stricte entre les activités et les teneurs en métaux et le métal doit être ajouté *in vitro* pour observer la pleine activité de l'enzyme.

Cette classification a le mérite de reposer sur des données expérimentales mesurables qui comportent le repérage du métal intrinsèque parmi les métaux extrinsèques par (*a*) l'analyse de différents métaux au cours de la purification et (*b*) l'exament de l'évolution de rapports simples tels que métal/protéine, activité/protéine et métal/activité ; mais elle n'implique pas un jugement *a priori* sur des différences présumées de fonction, de composition, de structure entre les métalloenzymes et les complexes métal-enzymes.

Les métalloenzymes et les complexes métal-enzymes se distinguent par leur constante d'affinité pour le métal associé, beaucoup plus grande pour les premières ; elles constituent les extrémités d'une échelle comportant la possibilité de nombreux intermédiaires.

Parmi les exopeptidases, la carboxypeptidase se situe du côté des métalloenzymes et la leucine-aminopeptidase du côté des complexes métal-enzymes (VALLEE, 1960) mais nous ne savons rien des amino-carboxypeptidases.

2. *Métal, test de différenciation*

Ce critère est-il valable pour admettre l'individualité de certaines amino-carboxypeptidases ? La question mérite d'être posée puisque c'est essentiellement sur cette base qu'a été postulée l'existence de « *d*-dipeptidase », « glycylleucine dipeptidase », « glycylglycine dipeptidase ».

On doit distinguer ici deux cas selon que le critère est appliqué à des extraits bruts ou imparfaitement purifiés ou au contraire à un matériel purifié à spécificité uniquement amino-carboxypeptidasique.

— Appliqué à des extraits bruts, — c'est le cas des recherches analysées plus haut — il est évident que ce critère peut être tout à fait erroné. Nous avons vu en effet la complexité de la plupart des extraits biologiques qui renferment à la fois des amino-carboxypeptidases et des aminopeptidases hydrolysant aussi les dipeptides et elles-mêmes activables par des métaux différents des métaux activateurs des aminocarboxypeptidases.

De plus, le même métal peut affecter de la même façon l'activité de peptidases et amino-carboxypeptidases différentes : Mn est activateur de la « GG-dipeptidase », « PG-dipeptidase », « GP-dipeptidase », cystéinylglycinase et de la leucine-amino-peptidase.

Dans ces conditions en l'absence de substrats spécifiques des amino-carboxy-peptidases, il n'est pas possible d'établir avec certitude la part qui revient à celles-ci sur la seule base des variations du rapport des activités dipeptidasiques provoquées par un métal.

— Appliqué à un matériel enzymatique purifié, à spécificité amino-carboxy-peptidasique, ce critère est-il valable ? La question est alors intéressante car elle revient à poser le problème du rôle des métaux dans l'activité et la spécificité des métallopeptidases. On peut se demander en effet si les métaux ne peuvent pas modifier la spécificité des peptidases comme le laisserait supposer les résultats de recherches récentes.

3. *Métal et spécificité : rôle du métal dans l'activité et la spécificité des peptidases.*

Différentes hypothèses ont été émises pour expliquer l'intervention des métaux dans l'activité des peptidases. Le métal, selon Najjar (1951) formerait d'abord un complexe avec le substrat et ce complexe servirait de vrai substrat à l'enzyme ; selon Smith (1948) il servirait d'intermédiaire dans la formation du complexe entre le substrat et l'enzyme.

Les études cinétiques d'activation de la « GG-dipeptidase » du muscle de rat (Rabin et Crook, 1956) et de la levure (Nishi, 1958), ont été réalisées pour tenter de les vérifier. Leurs résultats concordent avec le schéma de réactions proposé par Smith. Cependant des données cinétiques seules ne peuvent en établir l'exactitude sans ambiguïté. Plus significatif est le fait que la carboxypeptidase privée de son métal est incapable de s'unir à un inhibiteur compétitif de l'enzyme natif (Rupley et Neurath, 1960).

Ainsi l'intervention du métal dans l'activité des métallopeptidases concernerait à la fois l'enzyme et le substrat peptidique.

— Du *côté substrat*, le métal interviendrait, dans le processus catalytique de l'hydrolyse de la liaison peptidique, en provoquant une redistribution des charges sur la molécule du substrat de sorte que la liaison peptidique devenue plus labile nécessiterait une énergie d'activation plus faible pour son hydrolyse (Rabin, 1960). Il pourrait intervenir aussi par l'affinité particulière qu'il peut avoir pour un substrat donné : ainsi Smith (1948 *c*) explique l'activation spécifique de la « glycylglycine dipeptidase » par le cobalt, par l'affinité de ce métal pour la glycylglycine au pH optimal de l'enzyme.

— Du *côté de l'enzyme*, chez les « complexes métal-enzymes », la fonction du métal reste tout à fait imprécise ; cependant le fait que certaines peptidases demandent un temps d'incubation avec le métal, pour leur pleine activité, montre clairement que le phénomène d'activation doit comprendre la formation d'un complexe métal-protéine.

Chez les « métalloenzymes » on a tenté l'approche expérimentale du rôle du métal en comparant les propriétés physiques de l'enzyme et de son apoenzyme. Les

résultats obtenus montrent que le métal peut jouer un rôle soit (*a*) purement *structurel* : l'*a*-amylase de *B. subtilis* est dissociée en subunités actives en présence d'agents complexants (Stein et Fischer, 1960), (*b*) *structurel et fonctionnel* : à l'électrophorèse ou à l'ultracentrifugation, la Zn glutamique déshydrogénase (Frieden, 1958) et la Zn alcool déshydrogénase de la levure (Käji, 1959) se dissocient en composants plus petits inactifs quand le métal est éliminé, (*c*) essentiellement *fonctionnel* : la molécule de carboxypeptidase n'est pas dépolymérisée, mais inactivée par élimination du zinc (Rupley et Neurath, 1960). Cependant la stabilité plus faible de la protéine libre de métal comparativement à la Zn-enzyme, suggère la possibilité de changements structuraux, limités à une petite région de la molécule, qui n'ont pu être détectés par les méthodes utilisées (Neurath, 1960). Mg joue aussi un rôle de stabilisant pour la leucine aminopeptidase (Smith et Spackman, 1955).

En définitive les faits exposés concordent à montrer que le métal intervient à la fois dans les structures de l'enzyme et dans l'établissement du complexe de Michaelis ; à la fois du côté du substrat et du côté de l'enzyme.

Pour ces raisons on peut concevoir que, jusqu'à un certain point, la spécificité d'une métallopeptidase dépend de son métal. Ainsi dans la mesure où le métal cofacteur peut être substitué à un autre sur le même apoenzyme, on pourrait concevoir un changement dans sa spécificité suivant le métal qui lui est associé.

La réactivation, par des métaux différents, de peptidases inactivées par dialyse ou au cours de leur purification, ou leur activation différentielle, est un fait connu depuis longtemps : la leucine aminopeptidase intestinale inactivée peut être réactivée par Mg, Mn, Co. Zn, Fe (Nguyen Van Thoai, 1950), l'aminopeptidase de la levure inactive vis-à-vis de LG acquiert cette activité par addition de divers extraits (Grassmann et *al.*, 1938 ; Schneider et Graaf, 1940-41), la leucine-aminopeptidase du rein de porc voit le rapport de ses activité LG/GL et LG/GG varier de façon significative lorsque l'enzyme est incubé en présence de Co ou Mn (Vescia, 1956).

Ces faits pouvaient aussi bien être interprétés par la présence de plusieurs enzymes en raison de la pureté incertaine de ces préparations mais il est maintenant acquis que (*a*) la substitution d'un métal à un autre sur l'apoenzyme est possible : Zn a été remplacé dans l'apoenzyme de la carboxypeptidase A par différents métaux avec restauration de l'activité de l'enzyme (Coleman et Vallee, 1960) et (*b*) de façon significative, cette substitution induit des changements notables dans ses activités relatives : les Mn, Co, Ni et Zn carboxypeptidases sont douées à la fois d'activités peptidasiques et estérasiques et les Hg, Cd et Pb carboxypeptidases d'activités estérasiques seulement (Coleman et Vallee, 1961). Quand la Zn carboxypeptidase est incubée avec Co^{++}, son activité estérasique demeure inchangée alors que son activité peptidasique est doublée (Folk et Gladner, 1960).

Il semble donc bien que la nature du métal lié à l'apoenzyme influe sur la spécificité de l'enzyme. Dans ces conditions l'activation différentielle des activités peptidasiques par les métaux, même dans les extraits enzymatiques purifiés, paraît un critère insuffisant pour établir l'existence de peptidases spécifiques.

Aussi, comme le souligne d'ailleurs Smith (1960), l'existence d'amino-carboxypeptidases telles que la « glycylglycine dipeptidase » doit-elle être considérée seulement comme une hypothèse de travail tant que l'enzyme n'aura pas été purifié.

Conclusions de l'introduction

1. *Saccharomyces cerevisiae* a retenu l'attention des biochimistes en ce qui concerne les enzymes protéolytiques, comme en beaucoup d'autres domaines, ainsi qu'en témoignent les nombreux travaux publiés sur ce sujet.

En dépit de l'ancienneté de la plupart de ceux-ci et des insuffisances de certains, que nous nous sommes efforcé de souligner pour faire la part des incertitudes, ils permettent de se rendre compte que ce microorganisme est doté d'un équipement protéolytique varié puisqu'il comprend : *des enzymes capables d'hydrolyser préférentiellement les protéines* (dont il serait intéressant de préciser la spécificité ainsi que les propriétés et la nature des phénomènes d'autoactivation dont ils sont doués) ; *une carboxypeptidase* (purifiée 400 fois, de spécificité étendue et originale par rapport à la spécificité des carboxypeptidases pancréatiques A et B) ; *une ou plusieurs amino-peptidases* et *une ou plusieurs amino-carboxypeptidases*.

Les travaux de l'école de GRASSMANN sur l'aminopeptidase et la « dipeptidase » de la levure ont été à l'origine de la définition de ces enzymes et on servi de base à l'établissement de la plupart des facteurs de la spécificité de l'amino-carboxypeptidase mais nous connaissons peu de choses des propriétés du matériel à spécificité amino-carboxypeptidasique isolé sinon de son inhibition par les complexants des métaux et de son activation différentielle par les métaux.

Saccharomyces cerevisiae paraît en définitive un matériel de choix pour l'étude de amino-carboxypeptidases : elle est une source particulièrement riche en activités spécifiques des dipeptides à propos desquelles un problème de spécificité relié aux activateurs métalliques a été posé dans les mêmes termes que pour les amino-carboxypeptidases d'origine animale.

2. Les amino-carboxypeptidases d'origine animale ne sont guère mieux connues. Le manque de pureté de la plupart d'entre elles, en raison des difficultés que présente la purification de ces enzymes particulièrement instables, et l'ambiguïté qui règne parfois sur la spécificité d'enzymes décrits comme « dipeptidases » sur la seule base de leur activité vis-à-vis des dipeptides, mettent l'accent sur la double nécessité de l'obtention d'un matériel le plus homogène possible et d'une identification rigoureuse des enzymes responsables des activités dipeptidasiques.

La spécificité étroite de l' « imidopeptidase » a été établie, mais nous ne savons pas grand-chose de la spécificité de la plupart des autres amino-carboxypeptidases dont l'existence a été avancée sur la base de leur activation différentielle par les métaux dont nous avons montré le peu de signification de ce point de vue.

3. Leur activation différentielle par les métaux est au contraire du plus grand intérêt ainsi que leur inhibition par les complexants, si nous relions ces propriétés à nos connaissances sur les métalloenzymes, notamment la carboxypeptidase, dont il a été montré que la spécificité paraît pour une part liée à la nature du métal fixé sur l'apoenzyme. Les amino-carboxypeptidases obtenues hautement purifiées, seraient sans doute un matériel intéressant pour poursuivre ces recherches de spécificité liée au cofacteur métallique à condition toutefois que leur nature métalloprotéique soit précisée et qu'il soit possible d'obtenir leur apoenzyme sous une forme réactivable.

Ainsi un des principaux problèmes relié à l'étude des activités dipeptidasiques concerne (a) *la nature métalloprotéique éventuelle et* (b) *l'individualité et la spécificité des enzymes qui sont responsables de ces activités.*

4. La large distribution des activités dipeptidasiques, leur concentration élevée dans les organes doués d'une haute activité biologique (foie, rein) et dans les cellules à croissance rapide (coléoptiles, levures, tumeurs) posent le problème de leur signification biologique et mettent l'accent sur l'intérêt d'une meilleure connaissance des enzymes responsables de ces activités.

CHAPITRE PREMIER

RECHERCHES PRÉLIMINAIRES

Nous avons vu dans l'introduction que l'équipement protéolytique de la levure comporte, comme celui de beaucoup d'autres milieux biologiques, des enzymes à spécificité aminopeptidasique, capables d'attaquer aussi les dipeptides.

Il était donc indispensable, avant d'aborder la purification et l'étude du matériel amino-carboxypeptidasique, d'identifier les enzymes responsables des activités dipeptidasiques de *Saccharomyces cerevisiae ellipsoïdeus* afin d'arrêter notre choix sur les substrats paraissant les plus spécifiques de l'amino-carboxypeptidase. Les protocoles de mesure de ces activités permettant d'apprécier quantitativement l'enzyme, ont été ensuite établis.

Ce premier chapitre est consacré à ces recherches préliminaires.

Techniques utilisées

Mesure des activités peptidasiques

Les activités peptidasiques sont mesurées par le titrage des groupes aminés libérés lors de l'hydrolyse des peptides par les extraits enzymatiques, suivant la technique de Grassmann et Heyde (1929). Les unités d'enzyme sont définies par la quantité d'enzyme nécessaire pour hydrolyser par minute, une micromolécule de substrat *l* et les activités spécifiques (C), exprimées par le nombre de micromolécules hydrolysées par minute et par mg d'N protéique. Les protéines sont déterminées par la technique de Lowry (1951).

Les activités protéinasiques sont mesurées, suivant la technique de Anson (1938), par le titrage colorimétrique de la tyrosine libérée lors de l'hydrolyse de l'hémoglobine de bœuf ($N.B.C_0$). Les unités de « protéinase » correspondent aux quantités d'enzyme nécessaires pour produire en 10 minutes une micromolécule d'acide aminé et les activités spécifiques, aux unités par mg N protéique.

Matériel biologique

Levures ayant pour origine une souche de *Saccharomyces cerevisiea* Hansen var. *ellipsoïdeus* cultivées en aérobiose sur jus de raisin dilué, enrichi en phosphate d'ammonium et stérilisé, ou encore sur le milieu synthétique suivant : peptone 2,5 g, saccharose 70 g, phosphate diammonique 1,5 par litre, acide tartrique q.s.p., pH 3,5. Récoltées par centrifugation et lavées, elles sont ensuite conservées congelées. Les extraits enzymatiques bruts correspondent à des autolysats dont le procédé d'obtention sera précisé plus loin.

Résultats expérimentaux

I. — Activités peptidasiques de Saccharomyces cerevisiae ellipsoïdeus.

Le matériel enzymatique extrait des levures par autolyse sous toluène à pH 7,0, présente des activités peptidasiques variées (tabl. 1) dont les plus importantes quantitativement concernent GL [1]. AG, LG et LGG. GG, GGG, Cl Tyr et ClGG sont hydrolysées mais respectivement environ 10, 20, 100 fois moins vite ; l'hémoglobine de bœuf l'est également.

TABLEAU I

Activités peptidasiques d'autolysats de levure exprimées en µmol de substrats hydrolysées par minute et par ml d'extrait enzymatique

	GL	AG	LG	GG	LGG	GGG	Cl Tyr	Cl GG	Hémoglobine
Autolysat 1	18	9,3	4,3	0,6	10,6	0,53			0,08.
Autolysat 2	35	16	8,3	0,7	14,5	0,70	0,18	0,10	0,10
Autolysat 3		11	8	0,3	12,0	0,34	0,13		

Hydrolyses réalisées à 40°C en milieu tamponné à pH 5,0 pour l'hémoglobine, 6,0 pour ClTyr et Cl GG, 7,0 pour LGG et GGG, 7,8 pour GL, AG, LG et GG.

Autolyse réalisée dans les conditions les meilleures pour l'extraction des activités dipeptidasiques : sous toluène à pH 7,0 durée 16 heures.

La comparaison des activités spécifiques d'extraits peptidasiques bruts de différentes origines (exprimées en pourcentage de substrat hydrolysé par minute et par mg d'azote protéique), donne une indication de l'intérêt de la levure comme matériel peptidasique.

Origine	LGG	GG	Références
Thymus de veau	4,8		(Fruton et *al.*, 1948)
Muscle de lapin	1,6	0,4	(Smith, 1948 *d*)
Utérus humain		16,8	(Smith, 1948 *c*)
Muqueuse intestinale de chien .		15,3	
Levures	6,3	14	extrêmes rencontrés dans notre travail.
—	10,9	1,2	

Du point de vue qualitatif, l'hydrolyse de ces substrats laisse entrevoir la complexité du matériel peptidasique de la levure dont l'essentiel cependant en fonction des conditions d'extraction choisies, est consitué d'activités poly et dipeptidasiques.

[1] GL, AG, LG, GG, LGG, GGG, Cl Tyr, Cl GG, *dl*-gylycylleucine, *dl*-alanylglycine, *dl*-leucylglycine, diglycine, *dl*-leucylglycylglycine, triglycine, chloracétyl *l*-tyrosine, chloracétyldiglycine.

Cette complexité est confirmée par l'hydrolyse de dipeptides N, C et N-C substitués (tabl. 2) qui témoigne bien de la présence dans la levure de carboxypeptidases, aminopeptidases, amino-carboxypeptidases, et endopeptidases.

Le blocage de l'un des groupes polaires libres ou des deux de AG et GG entraîne en effet des variations significatives de la vitesse d'hydrolyse de ces deux dipeptides par rapport aux substrats substitués correspondants.

TABLEAU 2

Activités peptidasiques des extraits bruts exprimées en µmol de substrat hydrolysées/minute/ml d'autolysat dialysé.

Substrats	µmol/min/ml	Hydrolyse poursuivie à 40°C aux pH :
AG	6,6	8,0
GG	1,3	8,0
AG amide	2,7	7,0 (7,0 < pH opt. < 8,0)
GG amide	0,14	7,0 (7,0 < pH opt. < 8,0)
Carbobenzoxy AG	0,2	6,0 (pH opt. ≠ 6,0)
Carbobenzoxy GG	0,1	6,0 (pH opt. ≠ 6,0)
Carbobenzoxy AG amide	0,12	5,0 (5,0 < pH opt. < 6,0)
Carbobenzoxy GG amide	0,12	5,0 (5,0 < pH opt. < 6,0)

La forte inhibition ainsi provoquée des activités AG et GG met en particulier nettement en évidence l'existence d'une amino-carboxypeptidase hydrolysant ces substrats.

La présence d'endopeptidase pressentie par l'hydrolyse de substrats protéiques (cf. les travaux de GRASSMANN et LENNEY) est confirmée par l'hydrolyse des dipeptides N-C substitués.

Il est à noter aussi la faible part qui revient aux endo et carboxypeptidases parmi ces activités peptidasiques, dans les conditions expérimentales d'extraction des activités choisies.

II. — IDENTIFICATION DE LA FRACTION AMINO-CARBOXYPEPTIDASIQUE

Dans un milieu aussi complexe et en l'absence de substrats spécifiques des amino-carboxypeptidases, cette identification est difficile ; nous avons donc cherché à différencier indirectement les matériels peptidasiques par l'étude des variations des activités les plus importantes quantitativement, en fonction du pH, et au cours de divers essais d'activation ou d'inactivation partielle et de fractionnements par solvants organiques ou chromatographiques. Les substrats suivants ont été retenus pour cette étude : LGG, GGG, LG, AG, GG et GL.

Les activités en fonction du pH. — Mesurées sur des extraits fractionnés à l'acétone, elles mettent en évidence essentiellement deux zones de pH optimal

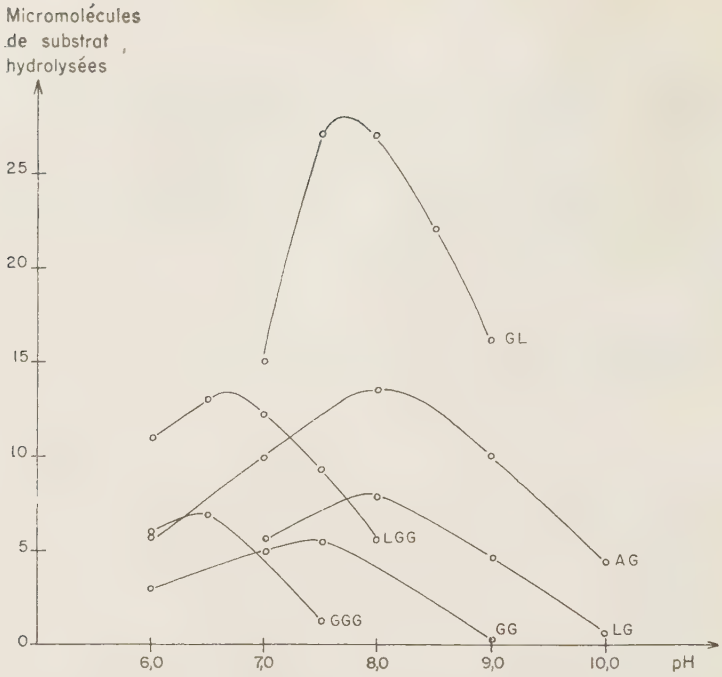


FIG. 1. — *Activités peptidasiques mesurées en fonction du pH*

Les activités étaient mesurées en milieu tamponné aux différents pH à 40°C. à partir d'extraits enzymatiques correspondant à un précipité acétonique 0-0,5 vol. d'acétone pour LGG et GGG et 0,5-1 vol. pour AG, GG, LG, GL.

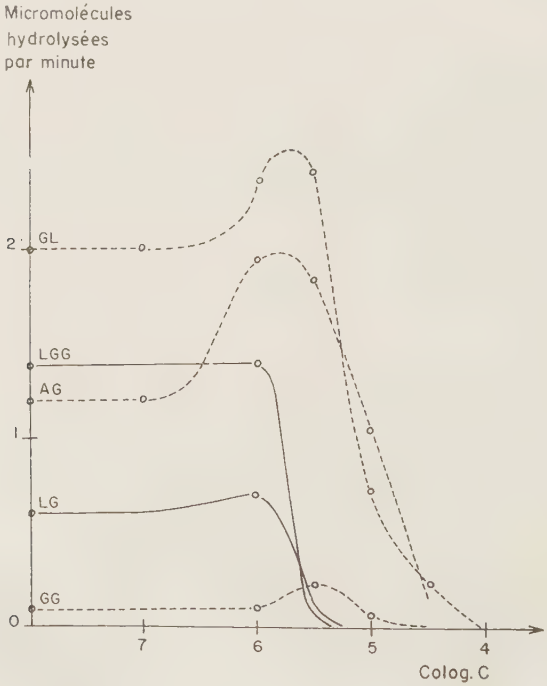


FIG. 2. — *Effet de la concentration en EDTA sur les activités peptidasiques*

La préparation enzymatique (précipité acétonique) est incubée avec le complexant à pH 7,5 pendant 1 heure à 0°C avant l'addition du substrat. Activités mesurées à 40°C au pH 7,0 (LGG), 7,5 (GG), 8,0 (LG GL, AG).

différentes : l'une voisine de 6,5-7,0 pour LGG et GGG, l'autre voisine de 7,5-8,0 pour les activités dipeptidasiques.

Les activités (Cl Tyr et CBZ AG présentent un pH optimal compris entre 5,0 et 6,0 comme l'activité endopeptidasique GBZ AG amide.)

L'action des complexants (EDTA). — A partir d'une certaine concentration, EDTA inhibe complètement les activités peptidasiques testées. (fig. 2) Cependant, à la différence des activités LG et LGG, les activités dipeptidasiques AG, GG et GL passent d'abord par un seuil d'activation à une concentration en complexant où les activités LG et LGG sont inhibées. De ce point de vue l'activité LG se différencie des autres activités dipeptidasiques et se classe du côté de l'activité LGG.

Cette inhibition par EDTA suggère le rôle essentiel des métaux dans les activités peptidasiques de la levure.

L'action des métaux. — Tous les métaux testés sauf Mg, sont inhibiteurs des activités peptidasiques à l'exception de l'activité GG (tabl. 3). Celle-ci se distingue au contraire par son activation par Co, Mn, Fe, inhibiteurs des autres activités ; les activités AG et GL ont un comportement analogue vis-à-vis de Zn plus inhibiteur que Co et Mn puis Fe ; l'activité LG se distingue des activités AG et GL par une moindre inhibition par Co et Zn et se rapproche en cela de l'activité LGG qui se distingue elle, par sa forte inhibition par Fe.

TABLEAU 3

Action des métaux sur les activités peptidasiques

(Activités rapportées à l'hydrolyse des témoins mesurés sans effecteur)

Substrats	Sans effecteur	Co	Mn	Fe	Zn	Cu	Mg	Ca
AG	100	30	30	66	5,3	30	125	
GL	100	37	43	51	11		77	70
GG	100	1 870	275	550	75	100	168	
LG	100	80	54	58	35		94	82
LGG	100	75	52	23	89		104	88

L'effecteur est incubé avec l'enzyme 15 minutes à 40°C avant l'addition du substrat. Dans les résultats rapportés ici la concentration en métal est de 10^{-3} mol. Les activités étaient mesurées à 40°C au pH optimal d'hydrolyse de chacun des substrats.

L'hydrolyse des substrats LGG et AG mélangés. — Apporte la preuve formelle que ces deux substrats sont hydrolysés par deux enzymes différents (tabl. 4). Aux erreurs d'expérience près, l'activité correspondant au mélange des substrats correspond bien à la somme des activités des substrats séparés.

TABLEAU 4

Hydrolyse des substrats mélangés LGG et AG

	Micromolécules de substrats hydrolysées			Résultats théoriques calculés en admettant l'existence de	
	AG	LGG	AG + LGG	deux enzymes	un enzyme
Expérience I	5	8,5	13	13,5	6,75
Expérience II	11	18,5	28	29,5	14,75

L'extrait enzymatique est mis à incuber avec les deux substrats AG et LGG séparément et en mélange. Les hydrolyses ont été conduites à 40°C à pH 7,5.

Les expériences qui suivent donnent des informations complémentaires sur le matériel peptidasique de la levure, elles apportent la preuve que LG est hydrolysé à la fois par l'enzyme. hydrolysant LGG d'une part et AG, GG et GL d'autre part.

La précipitation par l'acétone et l'éthanol. — met clairement en évidence (1) des différences de solubilité entre les activités et (2) la présence d'un inhibiteur naturel des activités GG.

1. *Les différences de « solubilité »* [1] : l'activité LGG est beaucoup moins soluble que les activités AG (et GG).

Dans l'acétone (diagr. 1), la solubilité de l'activité LGG est pratiquement indépendante du pH contrairement à celle des activités AG (et GG) beaucoup moins solubles à pH acide qu'alcalin. C'est à pH 8,0 que les différences de solubilité sont les plus grandes.

Dans l'éthanol (diagr. 2), la solubilité de l'activité LGG passe par un minimum à pH 6,0 qui est au contraire le pH ou les activités AG (et GG) présentent un maximum de solubilité.

Dans ces deux solvants la solubilité de l'activité LG, intermédiaire entre la solubilité des deux autres activités, est l'indice que ce substrat est hydrolysé par les deux enzymes attaquant LGG et AG.

Il a été vérifié aussi que le rapport des activités AG/GL ne subissait pas de variations significatives comme si les activités AG et GL étaient le fait d'un même enzyme.

2. *La présence d'un inhibiteur naturel des activités GG* : Les rendements de récupération très supérieurs à 100 de cette activité dans les précipités à pH 5,0 et 6,0 dans l'acétone et à pH 5,0 dans l'éthanol, que l'on n'observe pas pour les activités AG (tabl. 5), suggèrent qu'un inhibiteur de GG, sans action sur AG, a été éliminé comme si les deux substrats étaient hydrolysés par des enzymes différents.

[1] Ces expériences ayant été réalisées sur des extraits bruts, il ne peut être question ici que de solubilité apparente.

Sur milieu dialysé, on n'observe plus ces différences, il s'agit donc bien de l'élimination d'un inhibiteur.

La dialyse des extraits bruts entraîne aussi une activation de l'hydrolyse de GG et au contraire une inhibition de l'hydrolyse de AG.

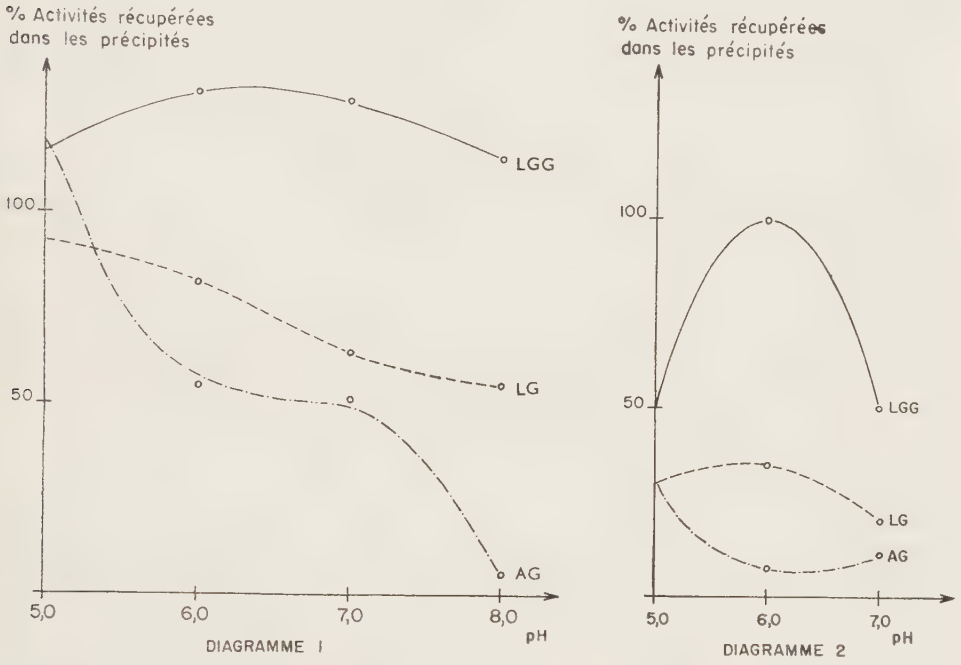


FIG. 3. — *Précipitation des activités peptidasiques à différents pH par 0,5 vol. d'acétone* (diagramme I) *et d'éthanol* (diagramme II)

L'extrait brut est additionné lentement de 0,5 vol. de solvants organiques refroidis à — 15°C. Les précipités récoltés par centrifugation au froid sont lavés deux fois à l'acétone ou à l'alcool, puis deux fois à l'éther, toutes ces opérations étant réalisées à basse température.

Les précipités sont dissous pour l'analyse dans du *Tris* 0,01 mol, pH 7,5. Les résultats relatifs aux activités GG ne figurent pas sur ces diagrammes, ils sont rassemblés dans le tableau 5.

TABLEAU 5

pH de précipitation	P. 100 d'activités récupérées dans les précipités			
	acétonique		alcoolique	
	AG	GG	AG	GG
5,0	118	320	31	163
6,0	56	250	7,5	10
7,0	52	166	12	47
8,0	6	16		

L'abaissement du pH des extraits enzymatiques à 4,0. — Entraîne la précipitation d'une fraction qui contient 50 à 85 p. 100 des activités LGG, 30 à 35 p. 100 des activités LG et des traces seulement des activités AG, GG et GL (tabl. 6).

TABLEAU 6

Effet de l'abaissement du pH sur la précipitation des activités peptidasiques

	Résultats exprimés en unités d'activités U récupérées dans les précipités					LGG / LG
	U AG	U GG	U GL	U LG	U LGG	
Extrait initial E_1 (1).	165	16,2			133	
Précipité corresp.	1,0	1,0			70	
Extrait initial E_2	75	42		35	64	1,8
Précipité correspondant	0	1,0		10	52	5,2
Extrait initial E_3	46	25	126	22	42	1,8
Précipité correspondant	0	0	traces	7,5	36	4,8

(1) Les extraits correspondent à un autolysat dialysé (E_1), débarrassé des acides nucléiques sur Dowex 1 (E_2) et à un précipité acétonique de (E_2) E_3. Un certain volume d'extrait enzymatique est amené à pH 4,0 par de l'acide acétique N pour E_1, 0,1 N pour E_2 et E_3. Le précipité formé est lavé deux fois avec du tampon acétate, pH 4,0 puis dissous dans *Tris* 0,1 mol, pH 8,0 pour analyse des activités.

Plus nettement que dans les expériences citées aux paragraphes précédents, l'activité LG se situe davantage du côté LGG que du côté des autres activités dipeptidasiques. Le rapport des activités LGG/LG dans les précipités est voisin de 5.

TABLEAU 7

Effet de la chaleur à différents pH sur les activités peptidasiques

	Résultats exprimés en unités d'activités U résiduelles					LGG / LG
	U AG	U GG	U GL	U LG	U LGG	
Extrait non traité	20,7	5	45	8,7	28	3,2
Chauffé à pH 5,0	0	0	0	1,25	6,25	5
Chauffé à pH 6,0	0	0	0	2,50	15,0	6
Chauffé à pH 7,0	0	0	0	3,8	21,5	6,1
Chauffé à pH 8,0	traces	traces	traces	4,0	21	5

L'extrait enzymatique porté aux pH 5,0 — 6,0 — 7,0 — 8,0 est maintenu à 50°C pendant 70 minutes, puis ajusté à pH 7,5 et analysé comparativement au témoin (autolysat dialysé) n'ayant subi aucun traitement.

Stabilité à la chaleur. — Les extraits enzymatiques traités par la chaleur perdent, dans les conditions expérimentales choisies, la totalité de leurs activités AG, GG, GL et gardent, suivant le pH, de 22 à 77 p. 100 de leurs activités LGG et de 14 à 45 p. 100 de leurs activités LG (tabl. 7).

Le traitement thermique permet donc de différencier nettement deux groupes d'activités : (*a*) AG, GG, GL labiles, (*b*) LG, LGG résistantes. Dans les extraits traités, le rapport constant 5-6 des activités LGG/LG indique que ces deux substrats sont hydrolysés par le même enzyme mais l'activité LG se situe aussi du côté dipeptidasique par une thermorésistance moins élevée que celle de LGG.

Comportement vis-à-vis des adsorbants. — Les activités LGG et LG diffèrent encore des activités AG, GL et GG par leur affinité moindre pour les adsorbants, charbon ou hydroxylapatite. Par la technique du « *batch* » (tabl. 8) on arrive à épuiser les extraits enzymatiques de leurs activités AG, GG et GL, en leur laissant une partie des activités LG et LGG.

TABLEAU 8

Comportement d'adsorption des activités peptidasiques

	Résultats exprimés en unités d'activités U					LGG / LG
	U AG	U GG	U GL	U LG	U LGG	
— Extrait initial I (*)	23	12	63	11	21	2,0
— Traité au charbon adsorbant	0	0	0	1,5	7,5	5,0
— Extrait initial II (*)	35	11,2	79	23	41	1,7
— Traité à l'hydroxylapatite:						
expérience I.....	0	0	0	1,6	8	5,0
expérience II	0	0	0	7,0	28	4,0

(*) Extraits enzymatiques débarrassés des acides nucléiques. Hydroxylapatite préparée par nous selon TISELIUS (1956) Charbon adsorbant de marque commerciale Négril. Un volume d'extrait enzymatique dialysé est traité sous agitation mécanique pendant 10 minutes avec la quantité d'adsorbant nécessaire à l'adsorption des activités AG, GG et GL puis centrifugé, le surnageant ajusté à pH 7,5 est analysé.

Dans les extraits privés d'activités AG, GG et GL, le rapport LGG/LG se situe encore aux environs de 5,0 indiquant bien qu'un même enzyme hydrolyse à la fois ces deux substrats mais, l'activité LG se classe aussi du côté dipeptidasique, comme dans l'expérience précédente, par son adsorption plus forte que celle de LGG.

L'analyse frontale rend compte également de ces différences de comportement entre les activités peptidasiques.

On voit sur la figure 4 que la colonne d'adsorbant est beaucoup plus rapidement saturée en activité LGG que AG.

Cette expérience laisse prévoir les possibilité de la chromatographie d'adsorption du point de vue de leur séparation.

Effectivement, l'activité LGG est plus facilement éluée des adsorbants que l'activité AG : *Tris* 1 mol pH 7,5 réalise sa désorption du charbon adsorbant Négril sur lequel reste irréversiblement retenue l'activité AG. Le rapport LGG/LG dans l'éluat se situe aux environs de 6,0.

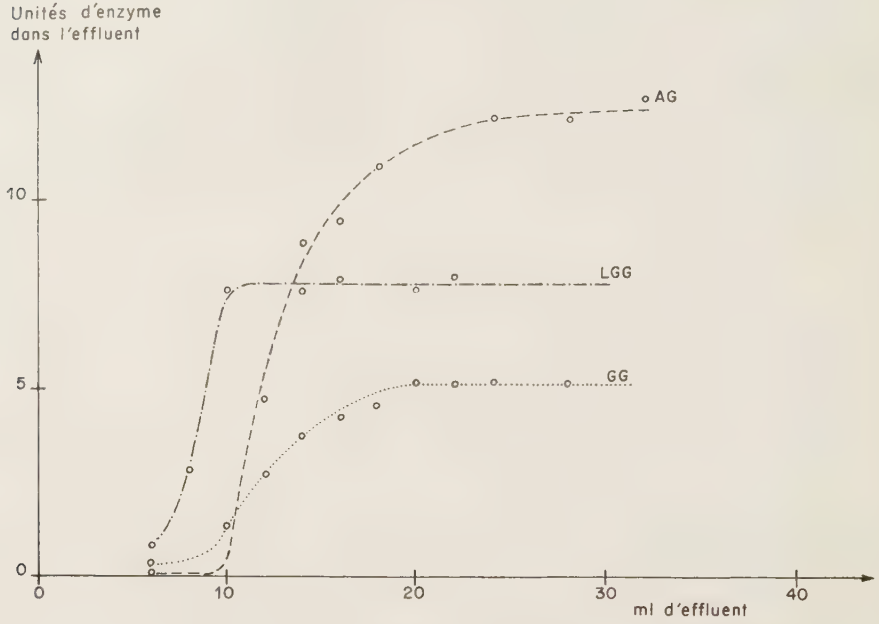


FIG. 4. — *Analyse frontale de l'amino-carboxypeptidase et de l'aminopeptidase*

L'extrait enzymatique est passé sur une colonne (20 × 0,9 cm) réfrigérée, renfermant 1 g de Négril et 2 g de poudre de cellulose. L'effluent recueilli par fraction de 2 ml est analysé jusqu'à ce que l'on retrouve dans l'effluent les mêmes activités que dans l'extrait primitif.

Le tampon phosphate 0,01 Mol, l'élue de l'hydroxylapatite. Avec ce dernier adsorbant il est possible de séparer sur colonne les activités peptidasiques en deux pics : le premier, contenant les activités LGG et une partie de l'activité LG, passe sitôt après le volume mort avec le tampon de rinçage de la colonne, le second, contenant les activités AG, GG et LG, est élué selon un gradient du même tampon (fig. 5).

Le premier pic présente une spécificité aminopeptidasique (hydrolyse de LGG du côté de la leucine vérifiée par chromatographie), le second, une spécificité amino-carboxypeptidasique (inhibition par blocage des groupes polaires libres).

En résumé les points les plus intéressants qui se dégagent de ces expériences, sont les suivants :

1. Les activités dipeptidasiques de *Saccharomyces cerevisiae ellipsoïdeus* ne sont pas le fait uniquement d'amino-carboxypeptidases, tout au moins pour ce qui concerne son activité LG. Ce substrat est en effet hydrolysé à la fois par un matériel à spécificité aminopeptidasique et un matériel à spécificité amino-carboxypeptidasique.

2. Le matériel à spécificité amino-carboxypeptidasique ne paraît pas dipeptidasiquement homogène : ses activités AG et GL ont un comportement tout à fait analogue vis-à-vis des complexants, des métaux, des solvants organiques, de l'abaissement du pH, de la chaleur et des adsorbants mais son activité GG, au contraire, se distingue par sa forte activation par les métaux inhibiteurs des activités AG, GL, LG et sa forte inhibition par des effecteurs sans action sur AG.

Le matériel amino-carboxypeptidasique de *Saccharomyces cerevisiae ellipsoïdeus* présente une analogie certaine avec celui isolé d'autres *Saccharomyces cerevisiae* et son activité GG, par sa forte activation par le cobalt, aux « glycylglycine-dipeptidases » de différentes origines.

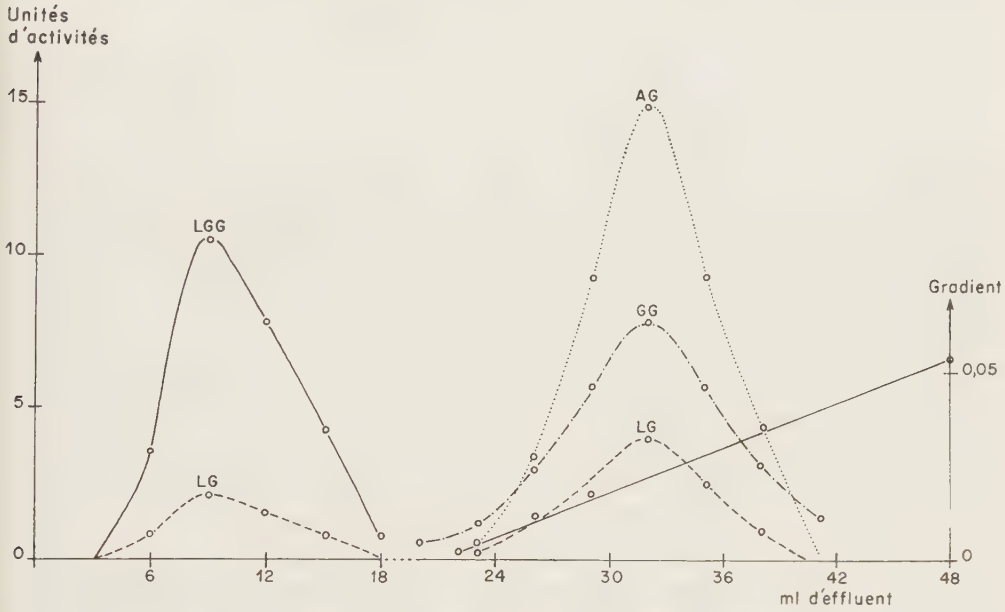


FIG. 5. — *Séparation de l'aminopeptidase et de l'amino-carboxypeptidase par chromatographie d'absorption sur hydroxylapatite*

L'extrait enzymatique dialysé (8 ml) renfermant 1 mg N protéique, 53 U AG, 20 U GG, 20 U LG, 48 U LGG est introduit sur la colonne (0,9 cm de diamètre) renfermant 500 mg d'hydroxylapatite (poids sec) équilibrée avec du tampon phosphate pH 8,0 0,001 mol. La colonne est rincée par 8 ml de tampon phosphate d'équilibration de la colonne puis le matériel dipeptidasique élué selon un gradient linéaire réalisé par affusion continue de tampon phosphate pH 8,0 0,25 mol dans un flacon mélangeur renfermant 100 ml de tampon 0,001 mol. Des fractions de 3 ml sont recueillies à la sortie de la colonne dès l'introduction de l'extrait enzymatique ; l'expérience a été conduite à + 3°C.

3. Le matériel à spécificité aminopeptidasique est moins soluble dans les solvants organiques (acétone, alcool), précipite à un pH où le second reste en solution, est plus stable, moins adsorbable (nous verrons aussi qu'il est d'un volume moléculaire plus élevé), si bien qu'il est possible de l'isoler en faisant appel à l'une ou l'autre de ces propriétés.

Par son inhibition par l'EDTA, son activité vis-à-vis de LG, il présente des points communs avec les leucine-aminopeptidases animales et l'aminopeptidase de la levure identifiée par JOHNSON mais diffère de l'aminopeptidase de GRASSMANN et de la tripeptidase animale.

4. Ces expériences réalisées dans le but de différencier les activités peptidasiques entre elles, nous ont donné aussi des informations précieuses du point de vue préparatif : 1) Ainsi 0,5 volume d'acétone à pH 8,0 ou 0,5 volume d'éthanol à pH 6,0 précipitent, à partir des extraits bruts, la quasi totalité de l'activité LGG et 10 à 14 p. 100 seulement des activités AG et GG. Le rapport des activités LGG/AG passe alors de 1 environ dans l'extrait brut à 10 ou 20 dans le précipité. Nous verrons plus loin les conséquences qui résultent de ces différences de solubilité du point de vue de la préparation de l'amino-carboxypeptidase. 2) L'éthanol est un solvant de précipitation des activités dipeptidasiques beaucoup moins efficace que l'acétone. 3) L'hydroxylapatite est un support chromatographique très sélectif de séparation de l'amino-carboxypeptidase.

III. Choix des substrats d'étude du matériel amino-carboxypeptidasique protocole de mesure des activités.

Les observations précédentes permettent d'écarter la leucylglycine des substrats amino-carboxypeptidasiques et justifient au contraire le choix de l'alanylglycine et de la glycyglycine. Par ailleurs ces deux dipeptides ont été considérés comme les substrats, le premier, d'une amino-carboxypeptidase polyvalente (Grassmann 1927), le second d'une amino-carboxypeptidase spécifique (Maschmann, 1943 *a*).

Les conditions de mesure de ces activités donnant une bonne proportionnalité entre les taux d'hydrolyse d'une part et les temps d'hydrolyse et les concentrations en enzyme d'autre part, ont été précisées de manière à rendre possible l'établissement de bilans corrects de récupération des activités. Ces recherches ont été poursuivies aux pH optimaux de ces activités : 8,0 pour AG, 7,5 pour GG et à une concentration en substrat *dl* du mélange Enzyme-Substrat de 0,05 mol.

Mesure des activités A G. – Les autolysats de levure ou les extraits enzymatiques préparés à partir de ceux-ci, en raison des divers effecteurs qu'ils contiennent, hydrolysent AG avec une irrégularité qui se traduit par des vitesses d'hydrolyse tantôt constantes ou croissantes dans les extraits bruts, tantôt décroissantes dans les milieux partiellement purifiés. La dialyse entraîne également une diminution de l'activité AG asique des autolysats comme s'il se trouvait dans les extraits bruts un activateur de l'enzyme.

Cette hypothèse s'est trouvée vérifiée en comparant les activités d'autolysats dialysés additionnés ou non de différents extraits susceptibles de contenir l'activateur naturel : extrait bouilli d'autolysat non dialysé, cendres de cet extrait bouilli. Dans ces conditions on observe une activation nette mais faible de l'enzyme de l'ordre de 15 à 30 p. 100.

Mais si on ajoute à l'enzyme dialysé une solution de cendres de levures, l'activation est beaucoup plus considérable : 150 à 250 p. 100 environ (tabl. 9).

Une recherche systématique parmi les cations et les anions a permis de préciser dans une certaine mesure la nature de cet activateur : tous les cations testés en particulier les activateurs classiques des peptidases : Mn^{++}, Zn^{++}, Fe^{++} avec ou sans cystéine, Co^{++}, se sont révélés des inhibiteurs puissants à l'exception de Mg^{++}

(tabl. 3) mais l'activation par ce dernier n'est pas en rapport (10 à 15 p. 100) avec celle observée avec les cendres de levure.

TABLEAU 9

Présence d'un activateur dipeptidasique dans la levure

	Micromolécules de substrat *l* hydrolysées par minute
Autolysat dialysé n° 1	
Témoin	0,65
+ cendres de levure	1,70
Autolysat dialysé n° 2	
Témoin	0,36
+ cendres de levure	1,30

Parmi les anions, Cl^-, $SO^{=}_4$, $PO_4^{\equiv}$ n'ont pratiquemment pas d'effet, $P_2O_7^{4-}$ (10^{-3} mol) est un inhibiteur puissant : 85 p. 100 d'inhibition. Par contre PO_3^- provoque à la concentration optimale, une activation de l'ordre de 250 à 300 p. 100 (fig. 6).

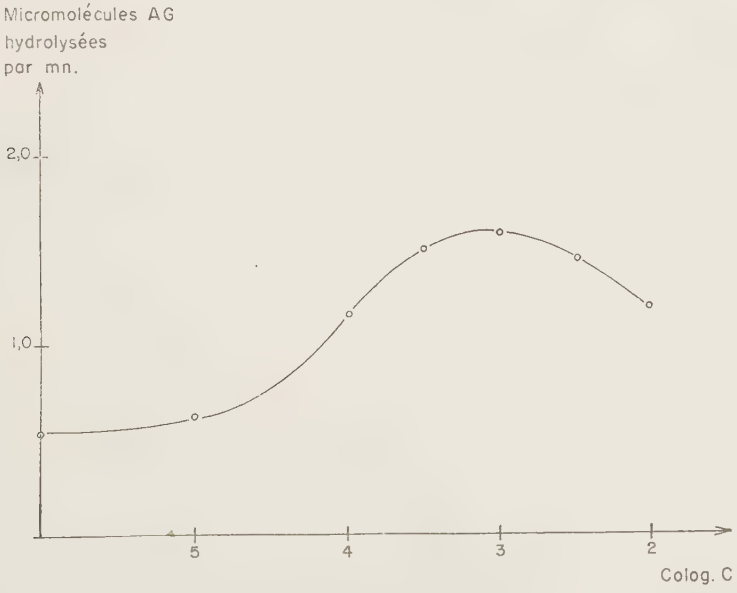


FIG. 6. — *Activation de l'hydrolyse de AG par l'anion PO_3^-.*

C, concentration PO_3^-.mol/l, calculée arbitrairement comme si le métaphosphate utilisé (Merck ou Prolabo) était l'hexamétaphosphate.

Nous verrons par ailleurs qu'en fait, cet activateur naturel agit comme complexant d'inhibiteur aux faibles doses et complexant d'un métal nécessaire à l'activité de l'enzyme à dose plus élevée de la même façon d'ailleurs que divers autres complexants (fig. 2 p. 40 et 19 p. 87). Son intérêt par rapport à ces derniers réside dans le fait qu'il a un pouvoir complexant du métal activateur moins élevé.

Sa présence dans le milieu d'incubation enzyme-substrat en quantité suffisante (10^{-3} mol) pour complexer les inhibiteurs sans agir sur le métal nécessaire à l'activité de l'enzyme, permet d'obtenir des hydrolyses régulières de AG.

L'inhibition de l'amino-carboxypeptidase de la levure par le pyrophosphate avait déjà été signalée dans des travaux antérieurs (Grassmann et *al.*, 1930), ainsi d'ailleurs que son activation par un activateur naturel (Grassmann *et al.*, 1938; Schales et Roux, 1950; Berger et Johnson, 1939), mais la nature de cet activateur n'avait pas été jusqu'ici précisée. Mais plus que sa nature exacte, l'important pour nous est le fait qu'il rend possible la mesure correcte des activités AG.

La mesure des activités GG n'offre pas de difficulté particulière sinon dans les extraits bruts où la présence d'inhibiteur entraîne des hydrolyses décroissantes en fonction du temps ; il n'en est plus de même après dialyse.

Le cobalt est un activateur puissant (tabl. 3) et l'activation maximale se situe à la concentration de 10^{-3} mol. (fig. 7).

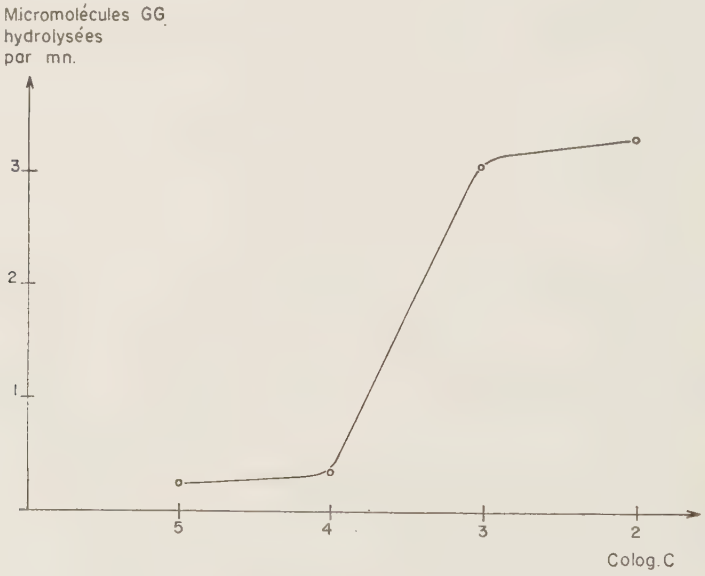


Fig. 7. — *Activation de l'hydrolyse de GG par le cobalt*
C, concentration Cl_2Co mol/l

En définitive les protocoles expérimentaux de mesure d'activités précisés sont les suivants : concentration dans le mélange enzyme-substrat, substrat *dl* 0,05 mol, pour AG : PO_3^- 10^{-3} mol pH 8,0, pour GG : Co 10^{-3} mol pH 7,5, température 40°C. L'enzyme est préincubé avec son effecteur 15 mn à 40°C avant d'être ajouté au substrat, les milieux étant 0,02 mol en *Tris* HCl aux pH voulus.

Dans ces conditions on observe une bonne proportionnalité entre les taux d'hydrolyse d'une part et les temps d'hydrolyse (fig. 8) et les concentrations en enzyme d'autre part. (fig. 9).

Les taux d'hydrolyse sont déterminés de façon à ne pas dépasser un taux d'hydrolyse de 40 à 50 p. 100 du substrat mis en œuvre.

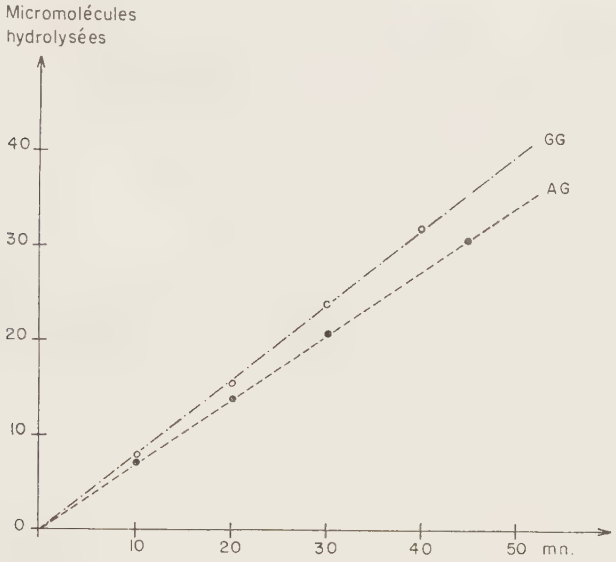


FIG. 8. — *Taux d'hydrolyse en fonction du temps*

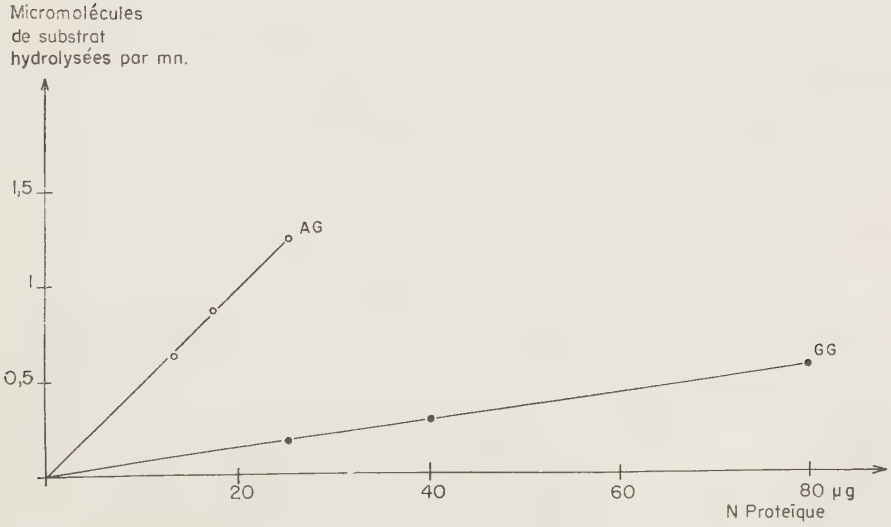


FIG. 9. — *Taux d'hydrolyse en fonction de la concentration en enzyme*

Résumé du chapitre I

Saccharomyces cerevisiae ellipsoïdeus possède un équipement protéolytique varié, abondant, dans les conditions d'extraction choisies, en activités aminopeptidasiques et amino-carboxypeptidasiques, plus pauvre en activités endo et carboxypeptidasique.

Une aminopeptidase hydrolysant LG 5 à 6 fois plus lentement que LGG a été identifiée ainsi qu'une ou plusieurs amino-carboxypeptidases, de comportement différent vis-à-vis des métaux et d'effecteurs présents dans les extraits bruts et éliminés en partie par dialyse ou lors de la précipitation des extraits enzymatiques par les solvants organiques.

En fonction de ces résultats, deux dipeptides ont été retenus pour l'étude de la fraction dipeptidasique : AG et GG ; les conditions de mesure de ces activités qui permettent d'apprécier quantitativement la teneur en amino-carboxypeptidases des extraits ont été précisées.

CHAPITRE II

EXTRACTION ET PURIFICATION DU MATÉRIEL AMINO-CARBOXYPEPTIDASIQUE

Nous donnons, ci-dessous, un exemple de la technique mise au point avant d'en justifier les différents points dans une discussion des résultats obtenus.

Ce procédé donne des résultats d'une bonne concordance d'une expérience à l'autre. Les quelques variations observées dans les activités spécifiques des extraits purifiés par rapport aux extraits bruts, viennent essentiellement de ce que la composition en N protéique, en activités dipeptidasiques et en effecteurs des extraits bruts, varient en fonction des lots de levure ou de leur temps de conservation au froid. Au stade 2, on observe aussi parfois quelques variations dans le rendement de la précipitation acétonique fractionnée ou sa sélectivité du point de vue séparation de l'aminopeptidase et de l'amino-carboxypeptidase, qui paraissent provenir également du temps de conservation des levures.

Une technique de purification a été décrite précédemment par nous (Cordonnier, 1960) qui comportait après l'extraction une dialyse de l'extrait brut, suivie d'une chromatographie sur Dowex 1 × 8 puis sur DEAE cellulose.

Dans celle-ci, la dialyse a été remplacée par une précipitation fractionnée acétonique qui offre pour principal avantage une meilleure élimination des polysaccharides et une élimination quasi totale des activités aminopeptidasiques ainsi qu'un taux amélioré de purification de l'amino-carboxypeptidase.

A — Description de la technique

Stade 1 : Extraction autolytique du matériel amino-carbopeptidasique

10 g de levure en pâte, issue d'une culture faite au laboratoire, sont plasmolysés 1 heure par 1 ml de toluène puis mis en suspension dans 10 ml d'eau distillée. Le pH du milieu (5,5 environ) est ajusté fréquemment à 7,0 par de la soude N. Après 18 heures d'autolyse à 35°-38°C, les levures sont centrifugées et 10 ml d'autolysat jaune brun (E_1) sont obtenus qui contiennent 4700 µg N protéique, 60 mg de polysaccharides, 66 unités d'AG (C 14), 5,5 UGG (C 1,1) 56 U LGG. Rapport AG/LGG = 1,18, d 278/260 mµ = 0,45. E_1 est ajusté à pH 8,0 avec de la soude N ; il se produit alors un précipité plus ou moins abondant de phosphates contenant des impuretés nucléiques. Il est parfois nécessaire d'amorcer la précipitation en frottant les parois du tube à centrifuger au moyen d'un agitateur de verre, ce précipité est éliminé par centrifugation.

Stade 2 : Élimination des matériels polysaccharique et aminopeptidasique par précipitation acétonique fractionnée de l'autolysat

E_1 (10 ml) refroidi à — 1°C est additionné de 0,5 volume d'acétone (5 ml) refroidie à — 15 — 20°C, versée goutte à goutte en agitant. Le mélange est maintenu 15 minutes dans une saumure à — 20°C (NaCl 1 partie, glace 3 parties), puis centrifugé à — 5°C. Le précipité formé, abondant et gommeux, est rejeté, il renferme environ 90 p. 100 des activités LGG, 90 p. 100 des polysaccharides et 10 à 20 p. 100 des protéines.

Le surnageant est rapidement ajusté à pH 7,0 et refroidi dans la saumure. On lui ajoute encore 0,5 volume d'acétone (5 ml), dans les mêmes conditions que précédemment. Après 15 minutes de séjour dans la saumure, le deuxième précipité formé, beaucoup moins abondant que le premier et d'aspect très différent est recueilli par centrifugation, lavé deux fois à l'acétone, puis deux fois à l'éther refroidi, puis séché sous vide (E_2). Il constitue la fraction dipeptidasique ; elle renferme 2 600 µg N protéique, 7 mg de polysaccharides, 61 U AG (C 23), 41 U GG (C 15), 5 U LGG, d 278/260 mµ = 0,75. Le rapport AG/LGG passe de 1,1 dans E_1 à 12 dans E_2 et 90 p. 100 environ des polysaccharides ont été éliminés. Sous cette forme de poudre acétonique, la fraction dipeptidasique peut être conservée à l'abri de l'humidité plusieurs mois à + 3°C.

Stade 3 : Élimination du matériel nucléique par percolation sur Dowex 1

E_2 dissous dans 10 ml *Tris* HCl 0,01 mol pH 8,0 est introduit sur une colonne réfrigérée (33 cm × 1,2) contenant 25 ml de Dowex 1 × 8 100-200 meshs, Cl^-, équilibrée préalablement avec *Tris* HCl 0,01 mol pH 8,0. Après passage d'un volume d'effluent correspondant au volume mort de la colonne (12,5 ml) on recueille 15 ml d'effluent (E_3) qui contiennent 1 620 µ g N protéique, 43 U AG (C 26), 22 U GG (C 14), d 278/260 mµ = 1,24.

Stade 4 : Élimination des protéines inactives par chromatographie de E_3 sur DEAE-cellulose.

E_3. (pH 8,0 ; 0,01 mol en *Tris* HCl) est introduit sur une colonne réfrigérée (20 cm × 0,9) contenant 5 ml de DEAE-cellulose équilibrée avec *Tris* HCl 0,01 mol pH 8,0. 15 ml de *Tris* HCl 0,15 mol pH 8,0 sont ensuite passés sur la colonne ; ils déplacent la plus grande partie du matériel protéique non dipeptidasique. Le matériel dipeptidasique est alors élué par 15 ml de Tris HCl 0,25 mol pH 8,0. L'éluat E_4 contient 50 µg N protéique, 0,5 mg polysaccharides, 36 U AG (C 700), 12 U GG (C 230), 0 LGG, d 278/260 mµ = 1,5. 95 p. 100 des protéines contenues dans l'extrait E_4 sont éliminés.

En définitive, dans cet exemple (*a*) les activités AG et GG sont purifiées respectivement 50 et 209 fois avec un rendement de 55 et 200 p. 100, (*b*) 98 p. 100 des polysaccharides ont été éliminés, (*c*) l'extrait enzymatique se trouve bien débarrassé des activités aminopeptidasiques et des impuretés nucléiques très abondantes dans les extraits bruts, puisque le rapport d 278/260 mµ passe de 0,45 dans E_1, à 1,5 dans E_4.

Remarques :

1. La technique antérieurement décrite (Cordonnier, 1960), appliquée au même extrait brut, donne au stade 4 pour même rendement en enzymes récupérés, des activités spécifiques AG (C 270) et GG (C 93) c'est à dire 2,5 fois environ plus faible, environ 1 p. 100 d'activité LGG résiduelle, et une moindre purification du point de vue des polysaccharides (éliminés à 80 p. 100 seulement) et du matériel nucléique (d 278/260 mµ = 1,32).

2. On peut adjoindre au schéma de purification proposé un stade 5 qui correspond à une chromatographie sur DEAE-cellulose de l'extrait E_4 dialysé contre *Tris* HCl 0,01 mol pH 8,0. L'élution selon un gradient de concentration permet d'atteindre des activités spécifiques C AG et C GG de l'ordre respectivement de 1800 et 800 dans le pic amino-carboxypeptidasique mais les pertes en enzymes sont importantes.

B — Justification de la technique

I — Stade 1 : l'extraction autolytique.

L'autolyse correspond à la dégradation enzymatique du protoplasme cellulaire qui suit la mort de la cellule ; mort pouvant résulter soit d'un épuisement de ses propres réserves, c'est l'autolyse spontanée, soit de l'action d'un poison cellulaire (toluène, chloroforme, éther, acétate d'éthyle, ...), c'est l'autolyse provoquée. Elle entraîne la solubilisation des éléments constitutifs du protoplasme qui diffusent dans le milieu extérieur à travers la paroi cellulaire à des degrés divers suivant la perméabilité de celle-ci.

Dans l'autolyse provoquée, cette perméabilité cellulaire est considérablement augmentée par le poison utilisé qui joue aussi le rôle de plasmolysant.

L'autolyse est un procédé classique d'extraction du matériel enzymatique de la levure. Son rendement dépend d'un certain nombre de facteurs (variables suivant l'enzyme étudié) que nous nous sommes efforcés de préciser pour ce qui concerne le matériel dipeptidasique : perméabilité cellulaire (plasmolyse), pH, durée et température de l'autolyse. Ces facteurs ont été envisagés au double point de vue d'un rendement optimal de l'extraction en activités dipeptidasiques et minimal en matériel nucléique. Nous verrons, en effet, par ailleurs, l'importance dans les autolysats de ce matériel nucléique, en regard du matériel protéique et les difficultés que représente son élimination tout au moins dans sa partie non dialysable.

Protocole expérimental

Dans les expériences décrites, les autolyses ont été réalisées en présence d'une partie de toluène (en volume) pour 10 parties de levures (en poids) ; après plasmolyse de 1 heure (au cours de laquelle la pâte de levure se liquéfie), un volume d'eau distillée égal au poids de levure mis en œuvre était ajouté et le pH fréquemment ajusté à la valeur désirée au moyen de soude N. Dès le début de l'autolyse en effet, le pH baisse rapidement et tend à se stabiliser aux environs de 5,5. A la fin de l'autolyse à la température choisie, l'autolysat était recueilli par centrifugation, ajusté à pH 8,0 et dialysé 48 heures dans un boyau de cellophane (Viscora) à 5°C contre du *Tris* HCl 0,01 mol au pH optimal déterminé de 8,0.

La dialyse permet en effet d'éliminer : (*a*) des effecteurs dipeptidasiques (inhibiteur et activateur de AG, inhibiteurs de GG), (*b*) les acides aminés rendant impossible le dosage colorimétrique de l'N protéique selon Lowry dans les extraits bruts, (*c*), les différents composés phosphorés dialysables 85 p. 100 du total environ, (*d*) la majeure partie des composés nucléiques extraits au cours de l'autolyse ; le rapport des densités optiques *d* 278/260 mμ passe de 0,45-0,50 avant dialyse à 0,85-1,0 après, suivant le degré de dégradation du matériel nucléique.

Toutes les mesures ont donc été effectuées sur les autolysats dialysés :

— les activités peptidasiques,

— l'N protéique (méthode colorimétrique de Lowry),

— la fraction nucléique non dialysable. Celle-ci a été appréciée par la mesure des densités optiques à 280 et 260 mμ dont le rapport traduit l'évolution des protéines par rapport aux acides nucléiques dans les préparations.

Cette mesure a été complétée par le dosage colorimétrique du phosphore non dialysable dans les extraits dialysés incinérés. Il a été montré en effet que le phosphore « protéique » de la levure avait en fait pour origine essentiellement les acides nucléiques et pour une faible part des polyphosphates (Bourdet, 1956).

1. *La plasmolyse.* — Les autolysats de levures non plasmolysés renferment seulement 10 p. 100 environ des activités AG et GG contenues dans les autolysats de levures plasmolysés en présence de toluène. Pour des levures récemment récoltées le temps de plasmolyse nécessaire est d'environ 1 heure. Les levures conservées congelées plusieurs semaines se plasmolysent plus rapidement.

2. *Le pH de l'autolyse.* — Est un facteur important de l'extraction ; c'est à pH 7,0 que les autolysats renferment le maximum d'activités dipeptidasiques et le minimum d'impuretés nucléiques.

TABLEAU 10

Influence du pH de l'autolyse

Autolyses poursuivies à 25°C pendant 24 heures

Autolysat dialysé	pH de l'autolyse		
	6,0	7,0	8,0
Unités AG/ml	4,6	7,7	6,8
Unités GG	1,25	2,9	2,0
N protéique (µg)	140	290	375
P_2O_5 non dialysable (µg)	480	230	370
d 280/260 mµ	0,75	0,81	0,61

3. *La durée de l'autolyse.* — A pH 7,0 l'extraction des activités dipeptidasiques est rapide puisque, après 16 heures environ, la totalité des enzymes extractibles par ce procédé se trouve dans les autolysats. Le taux d'enzyme baisse ensuite rapidement : après 48 heures d'autolyse, on observe une perte d'environ 35 p. 100 en activités AG et 55 p. 100 en activités GG contenues dans l'autolysat de 24 heures.

TABLEAU 11

Influence de la durée de l'autolyse

Autolyses poursuivies à pH 7,0 et 25°C.

Autolysat dialysé	Durée de l'autolyse				
	4 h	16 h	24 h	48 h	6 jours
Unités AG/ml	1,3	7,15	7,7	5	0,5
Unités GG	0,85	2,9	2,9	1,3	0,2
N protéique (µg)	116	324	290		225
P_2O_5 non dialysable (µg)	246	246	230		135
d 280/260 mµ	0,58	0,73	0,81		0,94

— L'extraction des protéines suit sensiblement celle des activités dipeptidasiques. Quant aux composés nucléiques ils sont extraits dès le début de l'autolyse.

— *Des activités nucléasiques et protéinasiques dans les autolysats*, sont mises en évidence au cours de l'autolyse par la dégradation des composés nucléiques et des protéines plus ou moins importante suivant le pH de l'autolyse, comme le montrent les variations du rapport d 280/260 mμ et de l'N protéique. Déjà nette à pH 7,0 (tabl. 11), elle est maximale à pH 6,0. A ce pH, après 6 jours d'autolyse, 80 p. 100 des composés nucléiques non dialysables et 70 p. 100 des protéines se trouvant dans un autolysat de 24 h, sont dégradés en produits dialysables. Malheureusement ce pH et cette durée d'autolyse sont incompatibles avec un bon rendement d'extraction du matériel dipeptidasique.

En fait ces résultats d'expériences d'autolyse traduisent un phénomène global qui est la résultante de l'extraction des constituants des cellules et de leur dégradation.

Celle-ci a été appréciée par incubation d'autolysats, débarrassés des débris cellulaires, à 40°C pendant 24 heures aux pH 6,0-7,0 et 8,0.

TABLEAU 12

Dégradation du phosphore non dialysable et de l'N protéique

	Autolysats incubés à pH		
	6,0	7,0	8,0
P_2O_5 dégradé (%).....	25	12,5	0
N protéique dégradé (%)..	72,5	36	41,5

On retrouve bien un maximum de dégradation enzymatique du P non dialysable et de l'N protéique à pH 6,0. Il est intéressant de constater que les activités nucléasiques sont plus importantes en présence qu'en absence de débris cellulaires (taux de dégradation à pH 6,0 respectivement 80 p. 100 et 25 p. 100) ce qui n'est pas le cas des activités protéinasiques.

Au cours de cette incubation, les pertes en activités dipeptidasiques sont importantes, elles sont les plus faibles au pH 7,0 où se situe aussi le minimum de la dégradation protéique mais elles sont encore de l'ordre de 50 p. 100 et 70 p. 100 respectivement pour les activités AG et GG.

Les autolysats renferment donc des nucléases et des « protéinases » particulièrement actives à pH 6,0, qui devraient permettre une autopurification intéressante des extraits bruts dans le cas d'enzymes plus résistants que les amino-carboxypeptidases.

Signalons également que la dégradation nucléique est plus poussée dans les autolysats de levures conservées congelées (d 280/260mμ des dialysats 0,90 à 1,1) que dans les autolysats de levures récemment récoltées (*d* 280/260mμ des dialysats 0,75 à 0,85).

4. *La température de l'autolyse.* — Si elle est portée de 25° à 40°, le rendement en enzyme est sensiblement le même à condition que l'autolyse soit de courte durée, mais la dégradation des composés nucléique et protéique est accélérée ce qui se traduit par une légère amélioration de la pureté des extraits bruts. La température de 40°C est une limite extrême à ne pas dépasser, l'expérience prouve en effet qu'un très faible dépassement de ce seuil entraîne des pertes importantes en activités dipeptidasiques ; pratiquement nous opérons aux environs de 35°-38°C.

TABLEAU 13

Influence de la température de l'autolyse
Autolyses poursuivies à pH 7,0, 24 heures

Autolysat dialysé	Température de l'autolyse	
	25°C	40°C
Unités AG/ml	11,8	13,1
Activités spécifiques (C)	(19,7)	(26,9)
Unités GG	3,2	3,0
Activité spécifique	(5,4)	(6,1)
N protéique (µg)	600	480
P_2O_5 non dialysable (µg)	300	200
d 280/260 mµ	0,75	0,86

5. *L'ajustement du pH de l'autolysat* à 8,0 est une nécessité ; il introduit le stade suivant, mais il permet en même temps d'éliminer une partie, faible mais non négligeable du matériel nucléique non dialysable.

TABLEAU 14

Élimination d'une fraction nucléique non dialysable par précipitation à pH 8,0.

Autolysat dialysé	Autolysat non traité	Autolysat traité
P_2O_5 non dialysable (µg)	450	175
d 280/260 mµ	0,71	0,89

Lors de cet ajustement, il se forme un précipité plus ou moins abondant suivant les cas ; il est parfois nécessaire d'amorcer la précipitation en frottant les parois du bécher avec un agitateur de verre.

Le précipité insoluble dans l'eau et en milieu alcalin, se dissout bien dans HCl N, il ne renferme ni cystéine ni tyrosine mais présente un spectre d'ARN avec un minimum à 238 mµ et un maximum à 260 mµ.

En définitive, les conditions d'extraction adoptées sont les suivantes : plasmolyse des levures en présence de 10 p. 100 de toluène pendant une heure, puis, après addition d'un volume d'eau égal au poids de levure mis en œuvre, poursuite de l'autolyse à 35°-38°C pendant 18 heures en ajustant fréquemment le pHà 7,0 durant les premières heures. Les levures sont alors éliminées par centrifugation et l'autolysat recueilli. Celui-ci est alors ajusté à pH 8,0 et vigoureusement agité comme indiqué plus haut avec une baguette de verre. Après 15 minutes il est à nouveau centrifugé ; le surnageant clair constitue l'extrait brut E_1.

Composition des extraits bruts

a) *Les activités peptidasiques.* — Nous avons donné des résultats au chapitre I (tabl. I). A titre indicatif, nous donnons un bilan des activités mesurées dans un autolysat (elles sont exprimées par le nombre de micromolécules de substrat hydrolysées par minute et par ml d'autolysat) : GL 42, AG 16, LG 8,3, GG + Co^{++} 0,70, LGG 14,5, GGG 0,70, Cl Ty 0,18, Cl GG 0,10.

Dans tous les cas c'est la glycylleucine qui est hydrolysée le plus rapidement : 2 à 3 fois plus vite que AG, 5 fois plus vite que LG, 30 à 60 fois plus vite que GG. En moyenne les extraits bruts contiennent 10 à 15 unités AG (C 25), 1 à 2 unités GG (C 3). Le rapport moyen AG/GG se situe entre 10 et 15.

LGG est l'activité peptidasique parasite quantitativement la plus importante, c'est sur son élimination qu'a porté notre effort au cours de la purification du matériel dipeptidasique.

b) *Les autolysats renferment en outre* (en g/100 ml) des :

• *protéines*, 0,25 à 0,5 p. 100,

• *matières sèches*, 4 à 5 p. 100, dont plus de la moitié dialysable,

• *composés phosphorés*, 0,1 à 0,2 p. 100 de P_2O_5 dont 80 à 90 p. 100 sont dialysables. La fraction non dialysable renferme 20 à 30 p. 100 de phosphore labile non dosable colorimétriquement sans hydrolyse acide préalable (HCl N) ; une partie est hydrolysée en P *ortho* lors de la percolation des extraits enzymatiques sur Dowex 1 × 8.

Deux impuretés non protéiques méritent une attention particulière en raison de leur abondance dans les extraits enzymatiques et des difficultés que représentent leur élimination ; il s'agit des *impuretés nucléiques et des polysaccharides.*

c) *Les impuretés nucléiques.* — L'allure du spectre dans l'UV des autolysats de levure est typique de l'ARN *d* 280/260 mμ 0,45 à 0,50 (fig. 10). Pour fixer les idées, du point de vue quantitatif, un autolysat non dialysé, dilué 100 à 200 fois présente la même absorption à 260 mμ (0,8-0,9) qu'une solution d'acide nucléique à 50 μg par ml. Ce qui correspondrait à une teneur en composés nucléiques de 0,5 à 1 p. 100.

80 p. 100 de ce matériel est dialysable donc sous forme peu condensée — les composés nucléiques de la levure sont dialysables jusqu'aux trinucléotides (Bourdet, 1956).

Les autolysats sont donc riches en composés nucléiques dont la majeure partie est sous une forme peu polymérisée ; mais ils renferment encore très approximativement 0,1 à 0,2 p. 100 de composés plus condensés à partir des tétranucléotides non

dialysables. Ce reste est difficile à éliminer dans des conditions de récupération acceptables des activités dipeptidasiques, autres que la percolation sur Dowex 1.

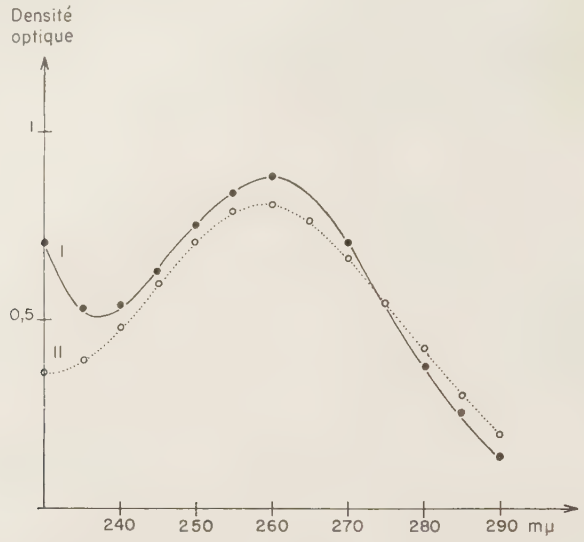


Fig. 10. — *Impuretés nucléiques des extraits bruts*
Spectres d'un autolysat de levure (I) et de l'ARN de levure (II).

d) *Les polysaccharides.* — Des différences importantes entre les teneurs des extraits purifiés au stade 4 du premier schéma de purification mis au point, en matière sèche et protéine, nous ont amené à rechercher l'impureté inconnue accompagnant les protéines au cours de la purification. Nous avons reconnu qu'il s'agissait de polysaccharides, essentiellement de mannane.

Étant donné ce que l'on sait sur la richesse de la membrane de la levure en polysaccharides, glucane et mannane (Northcote et Horne, 1952), il n'y a pas lieu de s'étonner de trouver de telles impuretés dans les extraits autolytiques de la levure.

Ceci constitue cependant un fait nouveau qui n'avait pas été signalé à propos des peptidases mais seulement de deux enzymes faisant partie des protéines liées aux polysaccharides de la paroi cellulaire, la fructosidase qui, purifiée 200 fois (Fischer et Khotis, 1951), contient encore 5 p. 100 des polysaccharides des extraits bruts et l'hexokinase (Boser, 1955).

Techniques expérimentales

L'étude des polysaccharides n'étant pas l'objet de notre travail, nous nous sommes contentés de les doser sous forme de sucres réducteurs par la méthode Gabriel Bertrand après hydrolyse acide en milieu HCl 2 N des extraits enzymatiques dialysés.

Un temps d'hydrolyse de 4 heures au bain-marie à 100° en tubes bouchés émeri s'est révélé nécessaire. Après hydrolyse, les sucres sont dosés sur l'hydrolysat déféqué et les résultats exprimés en mg d'hexose.

La recherche qualitative a été réalisée sur les hydrolysats (débarrassés d'HCl par évaporation sous vide et des cations et acides aminés par percolation sur Dowex 50) par chromatographie sur papier Wathmann n° 1, Solvant : Butanol, acide acétique, Eau 4-1-5. Révélateur : diphénylamine en milieu PO_4H_3).

Nature des polysaccharides : mannane.

La recherche systématique de tous les sucres dans les hydrolysats n'a pas été effectuée, mais aux concentrations réalisées sur les dépôts de départ, le glucose était absent alors qu'un très gros spot de mannose était révélé ainsi que des spots beaucoup moins importants de substances que nous n'avons pas cherchées à identifier, assez mal séparées et de mobilité moindre que le mannose.

L'absence ou la faible concentration du glucose dans ces hydrolysats s'expliquent par le fait que le glycogène et le glucane sont difficilement extractibles contrairement au mannose, libéré en partie par simple autolyse. Le glucane est de plus insoluble dans l'eau.

Teneur des extraits enzymatiques en polysaccharides.

Les extraits enzymatiques sont particulièrement riches en polysaccharides : ils en renferment, 8 à 10 fois plus que de protéines et ces polysacharrides représentent, après dialyse, 75 p. 100 de leur matière sèche.

TABLEAU 15

Composition des extraits enzymatiques

	I en mgr/ml d'extrait			II en % de matières sèches		
	Matière sèche	Protéine	Polysaccharides	Protéine	Polysaccharides	Polysaccharides / Protéine
Autolysat	70	2	17	2,8	24,2	8,5
Dialysat	13,4	1,2	10	8,9	74,6	8,3
Après percolation sur Dowex 1 × 8.....	11,2	0,72	8,3	6,4	74,1	11,5
puis sur DEAE-cellulose.	0,93	0,032	0,90	3,5	96,5	28

Dans cet exemple la purification a été réalisée selon le procédé décrit antérieurement (CORDONNIER, 1960).

La DEAE-cellulose est un moyen efficace de les éliminer. Mais ils le sont proportionnellement moins vite que les protéines de sorte que leur proportion par rapport à celles-ci augmente au cours de la purification : au stade 4, 85 p. 100 des polysaccharides et 95 p. 100 des protéines ont été éliminés mais l'extrait enzymatique est de 20 à 30 fois plus riche en polysaccharides qu'en protéine (tabl. 15 et 16).

Les polysaccharides sont retenus pour leur grande part par la DEAE-cellulose (tabl. 17).

Au cours du fractionnement des protéines, les tampons *Tris* 0,15 mol et 0,25 mol éluent respectivement 65 p. 100 et 20 p. 100 des polysaccharides de l'extrait enzymatique introduit sur la colonne.

Ils sont donc vraisemblablement associés dans les extraits dipeptidasiques avec des protéines ou des constituants chargés négativement. Lors du tamisage moléculaire des extraits enzymatiques sur Sephadex G 200, les polysaccharides passent sitôt

après le volume mort en même temps qu'un gros pic protéique. On sait d'ailleurs que le mannane est localisé dans les parois cellulaires en association avec les protéines. Ces résultats indiquent aussi les limites des possibilités de la DEAE-cellulose du point de vue de leur élimination. C'est une des raisons pour laquelle nous avons modifié notre technique de purification.

TABLEAU 16

Évolution des polysaccharides au cours de la purification.

	Protéines	Polysaccharides	Protéines	Polysaccharides
	mg	mg	éliminées (%)	éliminées (%)
Autolysat 10 ml	20	170	0	0
Dialysat 17 ml	20	170	0	0
Percolation Dowex 1 × 8 17 ml	12,2	141	39	17
Éluat dipeptidasique DEAE 25 ml	0,8	23	96	86

TABLEAU 17

Comportement des polysaccharides vis-à-vis de la DEAE-cellulose

	Polysaccharides	
	mg	%
Extrait enzymatique introduit sur la colonne	215	100
Fraction de rinçage de la colonne	31	15
Fraction éluée par *Tris* 0,15 mol	137	64
Fraction dipeptidasique éluée par *Tris* 0,25 mol,	42	20

II. — Stade 2 : Précipitation fractionnée de l'autolysat par l'acétone

Le stade 2 correspond à l'élimination de la plus grande partie des activités aminopeptidasiques et des polysaccharides.

1. *Élimination de l'aminopeptidase*

L'activité LGG est beaucoup moins soluble dans l'acétone que les activités AG et GG (chap. I), la différence de solubilité étant la plus grande à pH 8,0 (fig. 3, p. 43).

Nous avons donc étudié la précipitation de l'aminopeptidase et de l'amino-carboxypeptidase par différents volumes d'acétone à ce pH. Les résultats sont rassemblés sur la figure 11.

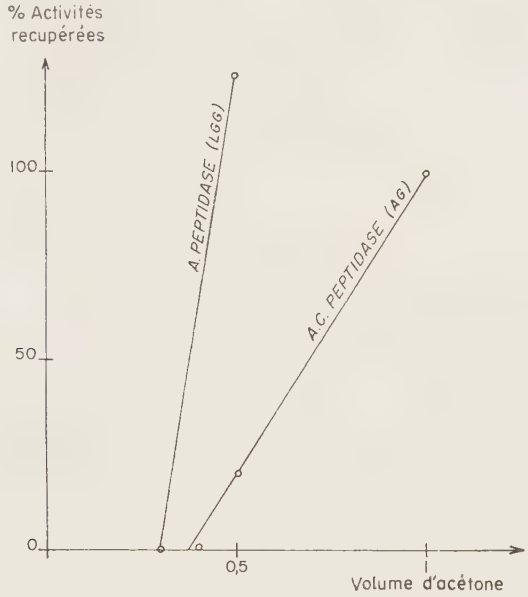


FIG. 11. — *Précipitation des peptidases par l'acétone à pH 8,0*
Les peptidases de l'extrait brut sont précipitées par 0,3, 0,4, 0,5 et 1 volume d'acétone. Les résultats sont exprimés en p. 100 d'activités récupérées dans chaque précipité. *a*-peptidase, *a.c*-peptidase : aminopeptidase, amino-carboxypeptidase.

A pH 8,0, l'aminopeptidase précipite entre 0,3 et 0,4 volume d'acétone et l'amino-carboxypeptidase entre 0,5 et 1 volume. Les différences de solubilité de ces deux enzymes dans l'acétone à ce pH sont donc assez grandes pour les séparer de façon préparative.

TABLEAU 18

Précipitation de l'amino-carboxypeptidase.

Des parties aliquotes d'un surnageant acétonique 0.5 vol pH 8,0 sont ajustées à 1 et 2 volumes d'acétone à pH 7,0 d'une part et 8,0 d'autre part et les quatre précipités correspondants analysés :

	Activités AG		Rendement en activités AG (%)	$d\,\frac{280}{260}$ mμ
	par mg N	par mg de précipité		
Précipité à pH 7,0				
0,5 — 1 vol.	30	2,9	70	0,66
0,5 — 2 vol.	20	0,55	70	0,54
Précipité à pH 8,0				
0,5 — 1 vol.	30	1,4	70	0,67
0,5 — 2 vol.	19	0,53	70	0,52

Les conditions de la précipitation de l'amino-carboxypeptidase dans le surnageant acétonique ont été précisées (volume d'acétone et pH).

Une addition supplémentaire de 0,5 volume d'acétone au surnageant suffit à précipiter toute l'amino-carboxypeptidase entraînable ; au-delà on précipite des impuretés protéiques et non protéiques et parmi elles des acides nucléiques.

Les résultats sont très voisins à pH 7,0 et 8,0 mais à pH 7,0 on précipite sensiblement moins d'impuretés non protéiques (2 fois moins). Le rendement dépend évidemment aussi de l'importance du préfractionnement acétonique (tabl. 19).

TABLEAU 19

Importance du préfractionnement sur le rendement en amino-carboxypeptidase

Des parties aliquotes d'extrait brut à pH 8,0 sont additionnées de 0,4 — 0,5 et 0,6 volume d'acétone, centrifugées et les surnageants amenés à pH 7,0 et 1 volume d'acétone. Les précipités sont analysés.

Précipités acétoniques	Récupération p. 100 dans les précipités			
	AG	LGG	N protéique	$d\,\frac{280}{260}$ mμ
0,4 — 1 vol.	100	20	45	0,70
0,5 — 1 vol.	72	10	40	0,72
0,6 — 1 vol.	65	0	38	0,75

Dans cette expérience, le préfractionnement par 0,6 volume d'acétone à pH 8,0 a permis d'isoler une fraction dipeptidasique débarrassée de la totalité de l'amino-peptidase.

Il n'est cependant pas nécessaire d'arriver à ce degré de purification car celle-ci sera poussée plus loin et à moindre frais lors de la chromatographie sur DEAE-cellulose.

L'évolution des rapports des densités optiques à 280 et 260 mμ montre que la purification du point de vue des impuretés nucléiques est peu importante mais non négligeable puisque ce rapport passe de 0,45 dans l'autolysat brut et 0,62 dans le dialysat à 0,70-0,72 dans le précipité acétonique 0,5-1 vol. d'acétone.

2. *Élimination des polysaccharides et des protéines*

Parallèlement à la précipitation des peptidases, celle des polysaccharides et des protéines a été suivie à pH 8,0 pour différents volumes d'acétone, (1) dans les extraits bruts et (2) dans les extrait purifiés.

1. — *Dans les extraits bruts*, (fig. 12), 75 p. 100 des polysaccharides précipitent entre 0,3 et 0,5 volume d'acétone et 10 p. 100 environ entre 0,5 et 1 volume.

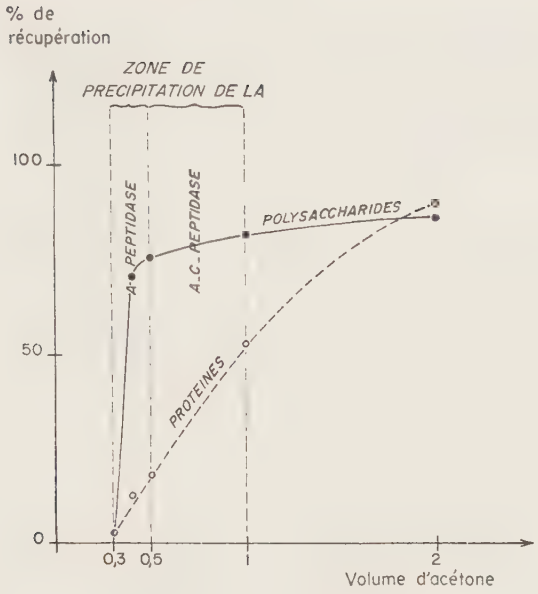


FIG. 12. — *Précipitation des polysaccharides et des protéines des extraits bruts par l'acétone à pH 8,0*

Ces composés sont analysés dans les précipités de l'extrait brut correspondant à 0,3, 0,4 0,5, 1 et 2 volume d'acétone. *a.* peptidase, *a.c*-peptidase : aminopeptidase, amino-carboxypeptidase.

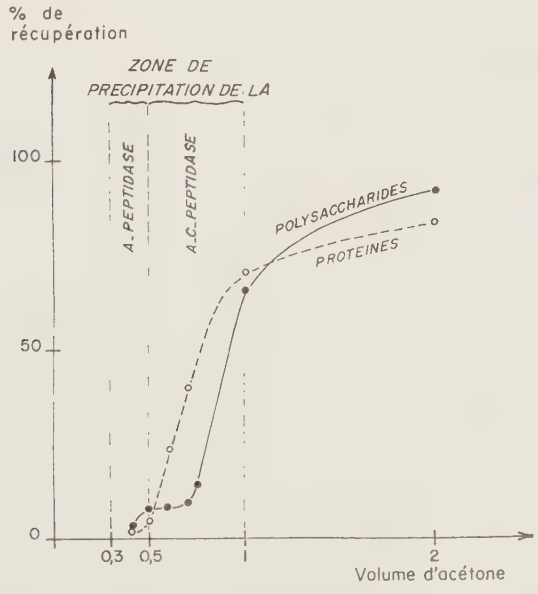


FIG. 13. — *Précipitation des polysaccharides et des protéines des extraits purifiés par l'acétone à pH 8,0*

a-peptidase, *a.c*-peptidase : aminopeptidase, amino-carboxypeptidase.

Au contraire les protéines, moins solubles, précipitent à 15-20 p. 100 environ entre 0,3 et 0,5 volume et à plus de 50 p. 100 entre 0,5 et 1 volume.

Autrement dit entre 0,3 et 0,5 volume d'acétone, précipite une fraction aminopeptidasique riche en polysaccharides et pauvre en protéines et entre 0,5 et 1 volume d'acétone une fraction dipeptidasique riche en protéines et pauvre en polysaccharides.

2. *Dans les extraits purifiés* (fig. 13), la purification des extraits bruts par dialyse (élimination des sels) et percolation sur Dowex 1 × 8 (élimination des acides nucléiques) modifient la solubilité des polysaccharides et des protéines dans des proportions beaucoup plus grandes que la solubilité des peptidases au point que les polysaccharides ne précipitent plus dans la fraction aminopeptidasique mais dipeptidasique.

Ainsi, suivant le degré de pureté de l'extrait enzymatique (extrait brut ou débarrassé des impuretés nucléiques), la précipitation fractionnée à l'acétone permet d'isoler une fraction soit dipeptidasique, soit aminopeptidasique, débarrassée de la plus grande partie des polysaccharides initiaux. Nous en donnons un exemple dans le tableau ci-dessous :

TABLEAU 20

Élimination des polysaccharides des peptidases par précipitation acetonique

Fractionnement acétonique	P. 100 de récupération dans les précipités			
	AG	LGG	Polysaccharide	Protéine
De l'extrait brut				
0,5-1 vol. (fraction dipeptidasique)	78	15	8	55
De l'extrait purifié				
0-0,5 vol. (fraction aminopeptidasique)	18	60	9	5

Dans cet exemple, l'amino-carboxypeptidase et l'aminopeptidase sont débarrassées l'une et l'autre de 90 % des polysaccharides. Il est à remarquer aussi que le fractionnement acétonique de l'extrait purifié précipite 5 % seulement des protéines dans la fraction aminopeptidasique ce qui entraîne une purification de 25 fois environ de cet enzyme par rapport à l'extrait initial. C'est donc une technique intéressante de purification de l'aminopeptidase.

Ces résultats montrent que les peptidases ne sont pas associées comme la fructosidase aux polysaccharides et justifient la place de la précipitation fractionnée par l'acétone, au stade E_1 pour l'amino-carboxypeptidase, et, après dialyse et percolation sur Dowex pour l'aminopeptidase.

Remarques.

1. Nous avons vérifié que la seule élimination des sels par dialyse ne suffit pas à expliquer des modifications aussi importantes dans ces solubilités et il est vraisemblable que la percolation sur Dowex 1 intervient en rompant certaines associations entre les protéines, les acides nucléiques et les polysaccharides.

Rappelons ici notre observation de la page 59, à savoir qu'une partie des composés phosphorés non dialysables est hydrolysée en P *ortho* par percolation sur Dowex 1.

On observe aussi des variations dans les pourcentages d'activités dipeptidasiques précipitées par l'acétone suivant la durée de conservation des levures après leur récolte au cours de laquelle des phénomènes autolytiques se poursuivent qui peuvent modifier aussi ces divers types d'associations.

2. La précipitation acétonique pourrait être remplacée par un traitement des extraits enzymatiques par l'hydroxylapatite suivant la technique du « *batch* ».

Cet adsorbant possède en effet la propriété de fixer les activités dipeptidasiques en laissant dans l'extrait traité les polysaccharides et la majeure partie de l'aminopeptidase (tabl. 21).

TABLEAU 21

Élimination des polysaccharides et de l'aminopeptidase par l'hydroxylapatite

	P. 100 de récupération				
	AG	LGG	Polysaccharides	Protéines	$d\frac{280}{260}$ mμ
Extrait enzymatique (1)	100	100	100	100	1,0
Surnageant après traitement à l'hydroxylapatite	—	—	93	—	
Fraction d'élution de l'amino-carboxypeptidase	80	13	5	50	1,2

(1) Extrait dialysé et chromatographié sur Dowex 1 × 8.

Après étude préalable des conditions d'adsorption et de désorption de l'aminocarboxypeptidase, une technique a été mise au point qui consiste à traiter, après dialyse et percolation sur Dowex 1 × 8, un volume V d'extrait enzymatique par le poids d'hydroxylapatite nécessaire à l'adsorption de toutes les activités dipeptidasiques qu'il contient. Après maintien en suspension de l'adsorbant pendant 15 minutes, le mélange est centrifugé et le surnageant, qui contient les polysaccharides, rejeté.

Le culot est lavé par deux fois 0,25 V de tampon phosphate 0,05 mol pH 7,0 qui élimine 20 p. 100 des protéines fixées. Après centrifugation, les activités dipeptidasiques adsorbées sont éluées par deux fois 0,25 V de tampon phosphate 0,25 mol pH 7,0.

Les résultats d'une application de cette technique, figurent sur le tableau 21. Comparés à ceux du tableau 20, ils montrent qu'elle permet d'éliminer pratiquement les mêmes quantités d'activités LGG, de polysaccharides et de protéines et davantage d'impuretés nucléiques (cf. tabl. 19) que la précipitation acétonique fractionnée. Mais elle est peu pratique car contrairement, à celle-ci (*a*) elle ne peut être appliquée au stade 1 en raison de la force ionique et des nombreux électrolytes (acides aminés en particulier) adsorbables de l'extrait brut, (*b*) elle nécessite, avant la chromatographie sur DEAE-cellulose. l'élimination du tampon phosphate soit par une nouvelle dialyse soit par percolation sur Sephadex G 25, (*c*) enfin il convient de préciser pour chaque préparation d'adsorbant sa capacité d'adsorption des activités

dipeptidasiques et le pouvoir éluant des tampons phosphates assez variables d'une préparation à l'autre, assez variable aussi suivant l'âge de l'adsorbant.

Nous verrons plus loin l'intérêt de l'hydroxylapatite qui, utilisée en chromatographie sur colonne, a un pouvoir de résolution des protéines comparable à celui de la DEAE-cellulose.

3. D'autres techniques pourraient être testées qui consistent soit à précipiter le mannane par la concavaline A (Cifonelli et Smith, 1955) soit à faire passer les protéines sous forme de gel dans le chloroforme en laissant les polysaccharides dans les extraits aqueux suivant la méthode de Sevag (Sevag et *al.*, 1938) qui permet aussi d'éliminer les acides nucléiques, à la condition que les enzymes ne soient pas dénaturés par ce procédé.

En définitive, le procédé de précipitation fractionnée à l'acétone est celui décrit au paragraphe A, page 54. Nous en donnons un exemple ci-dessous.

TABLEAU 22

Précipitation fractionnée à l'acétone de l'autolysat

	U AG	U GG	U LGG	U CITy	N protéique (mg)	Polysaccharides (mg)	Poids du précipité (mg)	$d\ \frac{280}{260}$ mμ
Extrait brut 40 ml	460	64	360	6,8	17,1	612		0,45 et dialysat 0,62
Précipitation fractionnée à l'acétone								
0 — 0,5 vol. pH 8,0..	100		332	3,0	5,2	530	1 000	0,59
0,5 — 1 vol. pH 7,0..								
fract. dipeptidasique..	360		60	2,0	9,4	50	190	0,70

La fraction dipeptidasique a été débarrassée respectivement de plus de 80 et 90 p. 100 de l'aminopeptidase et des polysaccharides.

Cet exemple met également en évidence les autres avantages de la précipitation fractionnée du point de vue de l'élimination des impuretés protéique, carboxypeptidasique, matière sèche, et nucléique aussi, comme le montrent les variations du rapport 280/260 mμ du premier précipité au second.

III. — Stade 3 : Percolation de E_2 sur Dowex 1 × 8

L'extrait E_2 contient des quantités importantes d'impuretés nucléiques dont une partie précipite en même temps que le matériel enzymatique si on essaie d'isoler celui-ci par précipitation à l'acétone, au sulfate d'ammonium ou encore par abaissement du pH aux environs de 4,5.

Des tentatives de séparation des matériels nucléique et protéique par la streptomycine, la protamine et le chlorure de manganèse à des pH et concentrations en réactifs différents, se sont révélées peu efficaces. Le charcoal donne des résultats plus satisfaisants mais variables.

Des difficultés analogues ont été rencontrées par divers chercheurs dans la séparation de l'ARN des protéines de la levure (Khouvine et Robichon, 1953) et nous l'avons déjà vu, des peptidases animales.

Par contre, l'emploi d'un échangeur anionique, Dowex 1 × 8, nous a permis de séparer dans certaines conditions, de façon très efficace, les fractions protéique et nucléique non dialysables ou précipitables par l'acétone. C'est ainsi que le rapport des densités optiques de 280/260 mμ passe de 0,75-1,0 dans l'extrait à purifier à 1,1-1,5 dans l'extrait passé sur Dowex (E_3). Le spectre de E_3 présente un maximum aux environs de 277-280 *mμ* et un minimum aux environs de 250 mμ. (fig. 14).

Fig. 14. — *Stade 3 : Élimination des impuretés nucléiques par percolation de E_2 sur Dowex 1*
Spectres de l'extrait enzymatique avant percolation (I) et après (II).

La plus grande partie de la fraction nucléique est retenue par la résine tandis que les protéines dipeptidasiques passent dans l'éluat sitôt après le volume d'effluent correspondant au volume mort de la colonne. Une fraction non dipeptidasique correspondant à 30 à 40 p. 100 des protéines mises sur la colonne, est également retenue par la résine.

L'étude systématique des facteurs intervenant dans le processus d'élimination des acides nucléiques nous a permis de préciser que le rendement de l'opération était fortement influencé par le pH et la force ionique du milieu à purifier. La pureté spectrale de l'éluat protéique renfermant les activités dipeptidasiques est sensiblement améliorée ; (*a*) en tamponnant l'extrait E_2 à pH 8,0 à une concentration la plus faible possible 0,01 mol en tampon *Tris* HCl ; (*b*) en procédant par percolation sur colonne plutôt que par la technique du « *batch* » ; (*c*) en calculant la charge de la colonne en matériel nucléique de façon à rester très en deçà de sa saturation. Pratiquement on introduit sur une colonne contenant un volume V de résine, la quantité de précipité acétonique correspondant à un volume 0,4-0,5 V d'extrait brut dissous dans le même volume de tampon *Tris* HCl 0,01 mol pH 8,0 (ou s'il s'agit de dialysat de E_2 un volume également de 0,4 à 0,5 V).

Par contre, cette pureté spectrale n'est pas améliorée par l'utilisation de résines ayant un plus faible pourcentage de réticulant (4 p. 100) ou plus finement divisées (200-400 meshs) ou encore par leur transformation de la forme chlorure en la forme formiate.

Comme nous le verrons plus loin, la percolation sur Dowex 1 augmente en outre très sensiblement l'efficacité de l'étape suivante, la chromatographie sur DEAE-cellulose, tant en ce qui concerne l'élimination des protéines inactives que celles des impuretés nucléiques.

A ce stade de la purification, le rapport d 280/260 mμ passe de 0,45 environ dans E_1 à 1,3-1,5 dans E_3.

Ces expériences de mise au point d'élimination de l'ARN ont été réalisées sur des autolysats dialysés. Dans ce cas le taux de récupération des activités dipeptidasiques est le plus souvent égal ou supérieur à 100 ce qui semble bien indiquer qu'une partie des inhibiteurs non éliminés par dialyse est retenue sur Dowex.

L'élimination des polysaccharides (expériences réalisées sur précipité fractionné acétonique E_2) améliore sensiblement les performances de Dowex en ce qui concerne l'élimination de l'ARN mais entraîne une diminution du rendement en activités dipeptidasiques récupérées.

Remarque : L'hydroxylapatite permet aussi d'éliminer les impuretés nucléiques (voir tabl. 21) mais dans des proportions moindres et dans des conditions moins pratiques.

IV. — Stade 4 : Chromatographie de E_3 sur diéthylaminoéthylcellulose. Élimination des protéines inactives

Dowex 1 × 8 permet une bonne séparation des fractions nucléique et protéique mais son pouvoir de résolution des protéines est faible ; il n'en est pas de même des échangeurs anioniques cellulosiques, en particulier la DEAE-cellulose, comme le montrent, dans le tableau ci-dessus, les résultats d'une expérience préliminaire effectuée suivant la technique du « *batch* » :

TABLEAU 23

Dans un tube à centrifuger gradué, on introduit 2,5 ml d'échangeur équilibré par *Tris* HCl pH 8,0 0,01 mol et 7,5 ml d'autolysat dialysé pH 8,0 0,01 mol en *Tris* HCl. Après agitation de 3 minutes, l'extrait enzymatique est centrifugé et l'échangeur rincé avec 7,5 ml de *Tris* HCl 0,01 mol pH 8,0 ; l'extrait et le tampon de lavage constituent la fraction 1 ; l'échangeur est rincé par 2 fois 7,5 ml *Tris* HCl 0,1 mol (fraction 2) puis par 2 fois *Tris* HCl 1 mol (fraction 3). Agitation de 3 minutes pour chaque opération.

	N protéique (μg)	Unités AG
Extrait enzymatique avant traitement (autolysat dialysé)	1 460	37
Fraction 1 — 0,01 mol	120	0
Fraction 2 — 0,1 mol	370	1,8
Fraction 3 — 1,0 mol	620	60

On constate que DEAE-cellulose, à l'inverse de Dowex 1, a la propriété de fixer énergiquement les protéines dipeptidasiques, dont l'élution est réalisée pour des concentrations en tampon comprises entre 0,1 et 1 mol en *Tris*. Par des expériences successives de chromatographie sur colonne, nous avons dès lors recherché la concentration de l'éluant permettant d'isoler le maximum de matériel dipeptidasique dans le minimum d'impureté protéique. Dans le tableau ci-dessous, nous donnons les résultats de l'expérience qui nous a permis de préciser ces concentrations.

TABLEAU 24

Chromatographie du matériel dipeptidasique sur DEAE-cellulose

	N protéique (µg)	Activités			
		AG		GG	
		U	C	U	C
Extrait enzymatique introduit sur la colonne (autolysat dialysé)	1 360	31	23	7,7	7
fraction 1 0,01 mol	85	0		0	
fraction 2 0,15 mol	348	2,5	7	1,1	3,5
fraction 3 0,30 mol	146	66	450	15	108
fraction 4 0,50 mol	82	2,5	27	2,5	27

Le protocole en était le suivant : colonne (20 × 0,9) réfrigérée contenant 5 mg d'échangeur (1) équilibrée préalablement avec *Tris* HCl pH 8,0 0,01 mol. Après percolation du dialysat (7,5 ml) pH 8,0 0,01 mol en *Tris* HCl, l'élution du matériel retenu sur la colonne est effectuée par 3 fractions de 15 ml de *Tris* HCl pH 8,0 de molarités égales respectivement à 0,15 mol, 0,30 mol et 0,50 mol.

Dans ces conditions, l'essentiel du matériel dipeptidasique est élué par *Tris* HCl 0,30 mol (2) et il ne renferme que 10 p. 100 environ de l'N protéique, ce qui entraîne une purification de 15 à 20 des activités dipeptidasiques, et 5 p. 100 environ des activités amino-peptidasiques contenues initialement dans l'extrait brut.

Rappelons également que 80 p. 100 environ des polysaccharides sont éliminés, dont l'essentiel se trouve dans la fraction 0,15 mol (tabl. 17).

Le taux de récupération des enzymes est supérieur à 100. La DEAE-cellulose comme Dowex 1, élimine donc une fraction de l'inhibiteur non éliminé par dialyse.

En prélevant les éluats à la sortie de la colonne par fraction de 3 ml, on obtient le diagramme d'élution (fig. 15).

L'examen de ce diagramme permet de constater que, par ce procédé : (*a*) la fraction dipeptidasique n'est pas une protéine homogène comme le montrent les

(1) Avant utilisation l'échangeur est lavé à la soude N jusqu'à ce que la densité optique à 280 et 260 mµ du liquide de lavage égale 0,03 environ, puis rincé à l'eau distillée jusqu'à neutralité. Il contient en effet des impuretés déplacées par la soude.

(2) 0,25 mol peut être aussi utilisé, il permet de récupérer moins d'N protéique dans la fraction dipeptidasique (2 à 5 p. 100 de moins) dont l'activité spécifique vis-à-vis de AG est multipliée par 1,2-1,3.

variations des activités spécifiques le long des pics ; (*b*) il n'y a aucune ébauche de séparation des activités AG et GG ; le rapport de ces activités spécifiques demeure en effet sensiblement constant aux erreurs d'expériences près.

L'élution par un gradient linéaire de la concentration de l'éluant ne permet pas davantage de séparer, à ce stade, les deux activités.

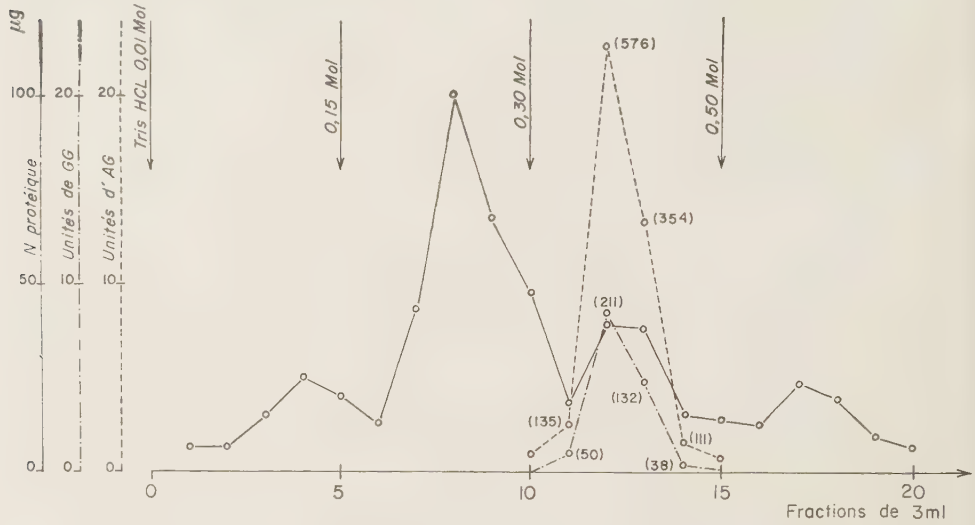


FIG. 15. — *Séparation chromatographique de l'amino-carboxypeptidase sur DEAE-cellulose*
Élution par changement d'éluant. Les nombres entre parenthèses expriment les activités spécifiques des fractions.

Ces expériences de chromatographie, reprises comparativement sur extrait dialysé avant (E_2) et après percolation sur Dowex 1 (E_3), montrent que la percolation préalable sur Dowex 1 augmente très sensiblement l'efficacité de la chromatographie sur DEAE-cellulose tant en ce qui concerne l'élimination des protéines inactives que l'élimination des impuretés nucléiques, sans changer le comportement chromatographique de l'amino-carboxypeptidase.

TABLEAU 25

Chromatographie sur DEAE-cellulose avant ou après percolation sur Dowex 1

Percolation sur Dowex I (E_3)	1 700 µg N C AG 80 C GG 19 $d\frac{280}{260}$ mµ = 1,1	⟶	Chromatographie sur DEAE (E_4)	180 µg N C AG 805 C GG 272 $d\frac{280}{260}$ mµ = 1,4
Dialyse (E_2) (schéma 1 ↑)	2 700 γg N C AG 48 C GG 11 $d\frac{280}{260}$ mµ = 0,89	Schéma 2 ⟶	Chromatographie sur D.E.A.E. (E'_4)	320 µg N C AG 465 C GG 110 $d\frac{280}{260}$ mµ = 0,87

La purification du matériel dipeptidasique suivant le schéma 1 (E_2—E_3—E_4) élimine 93 p. 100 de l'N initial contre 88 p 100 suivant le schéma (E_2—E'_4), les activités spécifiques de AG et GG étant respectivement multipliées par 16 et 24 contre 9 et 10. De plus, *d* 280/260 mμ est égal à 1,4 dans le premier cas et à 0,87 dans le second. Dowex 1 est supérieur à la DEAE-cellulose du point de vue de l'élimination des impuretés nucléiques, vraisemblablement par le fait que la force de l'éluant pour déplacer les activités dipeptidasiques dans le cas de la DEAE-cellulose, est suffisante aussi pour décrocher une partie de l'ARN.

La percolation sur Dowex 1 est donc une étape indispensable de ce procédé de purification.

Ces expériences de mise au point d'élimination des protéines inactives ont été réalisées sur des autolysats dialysés.

L'élimination des polysaccharides (expériences réalisées après précipitation acétonique fractionnée), ne modifie pas le comportement du matériel dipeptidasique sur DEAE-cellulose ; elle permet d'améliorer ses performances du point de vue de l'élimination des protéines et de l'ARN du fait déjà de l'élimination d'une fraction de ces matériels lors de la précipitation acétonique mais entraîne une récupération un peu plus faible des activités dipeptidasiques.

Pratiquement les résultats de la percolation sur DEAE-cellulose après précipitation acétonique correspondent à ceux obtenus après deux chromatographies successives selon le schéma de purification décrit antérieurement (Cordonnier, 1960).

En définitive, la technique adoptée est celle décrite à la page 54. Du point de vue pratique, la charge de la colonne est d'environ 1,5 mg N protéique pour 5 ml d'échangeur tassés sous une pression hydrostatique de 60 cm, la vitesse d'élution étant de 20 à 30 ml/h.

E_4 ne renferme plus que 1 à 2 p. 100 des protéines et polysaccharides contenus dans E_1, il est exempt d'aminopeptidase et d'activités protéinasiques et présente un spectre typique des protéines avec un rapport *d* 278/260 mμ = 1,5. A ce stade, sans doute en raison de l'extrême dilution des protéines, l'amino-carboxypeptidase est très sensible à la dialyse (40 p. 100 de perte après dialyse de 12 heures) et ne précipite plus à l'acétone, de même l'abaissement du pH n'entraîne plus la précipitation des protéines.

Il est aussi possible d'éluer les activités dipeptidasiques selon un gradient linéaire de concentration de l'éluant par affusion de *Tris* HCl 1 mol pH 8,0 dans 200 ml de *Tris* HCl 0,01 mol mais l'opération est plus longue et les activités dipeptidasiques recueillies dans un plus grand volume. De même l'utilisation de colonnes plus importantes (40 × 1,2 cm) contenant 15 ml d'échangeur s'est révélée moins avantageuse du point de vue rapidité, rendement en enzymes récupérés et taux de purification en raison d'une faible adsorption parasite de l'amino-carboxypeptidase sur l'échangeur.

Remarque

La chromatographie d'adsorption sur hydroxylapatite peut remplacer, au stade 4, la chromatographie d'échange d'ions sur DEAE-cellulose.

Après étude préalable par la technique du « *batch* » , des conditions d'adsorption et d'élution des activités dipeptidasiques en fonction de la molarité des éluants et du pH, la technique, dont nous donnons un exemple ci-dessous, a été mise au point.

Contrairement à ce qui se passe sur DEAE-cellulose, une fraction protéique importante, 50 p. 100, n'est pas retenue par l'adsorbant, on y trouve l'aminopeptidase (fig. 5, p. 47) de même que les polysaccharides (tabl. 21, p. 67) ainsi qu'une partie importante du matériel nucléique *d* 280/260 mμ = 0,65.

Les protéines retenues sur l'adsorbant sont éluées par les deux tampons successifs, le premier déplace le tiers environ des protéines mises en jeu avec 7 et 25 p. 100 respectivement des activités AG et GG, *d* 280/260 mμ = 1,1 ; le second, la fraction dipeptidasique, renferment 65 p. 100 des activités AG, 75 p. 100 des activités GG et moins de 5 p. 100 de l'N initial, *d* 280/260 mμ = 1,1.

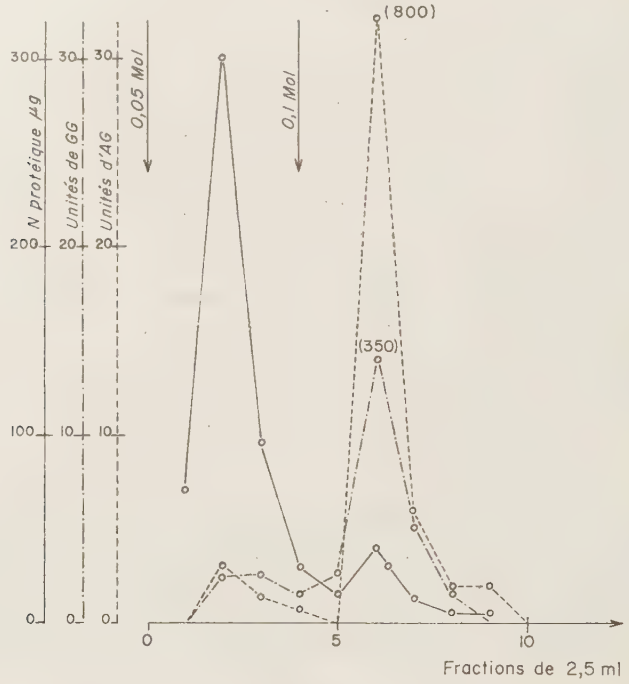


FIG. 16. — *Séparation chromatographique de l'amino-carboxypeptidase sur hydroxylapatite*

8 ml d'extrait enzymatique renfermant 1 740 µg N protéique, 66 U AG (C 37) et 27 U GG (C 15) *d* 280/260 mμ = 0,75 sont introduits sur la colonne (20 × 0,9 cm) réfrigérée, compactée avec 500 mg d'hydroxylapatite pH 8,0 équilibré avec tampon phosphate pH 8,0 0,001 mol, l'élution est réalisée par respectivement 10 et 15 ml de tampon 0,05 mol et 0,10 mol, débit de l'élution 8 à 10 ml/h. Les nombres entre parenthèses expriment les activités spécifiques des fractions.

Les éluants successifs peuvent être remplacés par un gradient (tampon 0,25 mol pH 8,0 dans 100 ml tampon 0,001 mol).

Ainsi, au stade 4 ; deux techniques peuvent être utilisées : soit la chromatographie sur DEAE-cellulose, soit la chromatographie sua hydroxylapatite.

La première est cependant supérieure du point de vue : (*a*) *taux de récupération des enzymes*, pour une purification vis-à-vis des protéines sensiblement égale, (*b*) *rapidité*, les vitesses d'élution étant de 20 à 30 ml/heure sur DEAE-cellulose contre 8 à 10 ml sur hydroxylapatite, (*c*) *reproductibilité des résultats* ; la capacité des hy-

droxylapatites préparées au laboratoire varient en effet quelque peu suivant le lot et le vieillissement de la préparation.

Nous verrons cependant plus loin l'intérêt que représente, du point de vue séparatif, l'hydroxylapatite par rapport à la DEAE-cellulose.

Résumé du chapitre II

Dans ce chapitre ont été précisées les conditions d'extraction et de purification du matériel dipeptidasique.

— Celui-ci est extrait des cellules de levure, après leur plasmolyse, par autolyse de 18-24 heures à un pH et une température donnés.

Au cours de la mise au point du procédé, des activités nucléasiques et protéinasiques ont été mises en évidence qui confirment les résultats acquis au chapitre précédent.

Les extraits bruts sont particulièrement riches en acides nucléiques, polysaccharides et en activités aminopeptidasiques parasites.

— Le schéma de purification comprend l'élimination de l'essentiel de l'aminopeptidase et des polysaccharides par précipitation fractionnée à l'acétone, des acides nucléiques par percolation sur Dowex 1 × 8 et des protéines inactives par chromatographie sur DEAE-cellulose.

Il permet de purifier le matériel dipeptidasique 50 et 200 fois par rapport aux activités AG et GG avec des taux respectifs de récupération de 60 à 200 p. 100. L'extrait enzymatique est bien débarrassé des impuretés nucléiques (d 280/260 mμ = 1,5 contre 0,45 dans l'extrait primitif) et ne renferme plus que 2 p. 100 des polysaccharides et 1 p. 100 des protéines primitifs ; il est exempt d'aminopeptidase, et d'activités protéinasiques.

— La percolation des autolysats dialysés sur Dowex 1 × 8 augmente la solubilité des polysaccharides dans l'acétone qui, lors de la précipitation acétonique fractionnée, passent alors dans la fraction dipeptidasique. Suivant le stade de cette percolation on peut donc obtenir soit une amino-carboxypeptidase soit une aminopeptidase débarrassées des polysaccharides.

— Indirectement un procédé de purification partielle (25 fois) de l'aminopeptidase a été mis au point qui permet d'éliminer 95 p. 100 des protéines, 90 p. 100 des polysaccharides et l'essentiel des acides nucléiques. Il comprend, après la dialyse des autolysats, une percolation sur Dowex 1 × 8 suivie d'une précipitation de l'aminopeptidase par 0,5 volume d'acétone à pH 8,0.

CHAPITRE III

ÉTUDE DU MATÉRIEL AMINO-CARBOXYPEPTIDASIQUE ISOLÉ

Ce chapitre est consacré à l'étude de la spécificité du matériel dipeptidasique isolé et de quelques-unes de ses propriétés notamment son comportement vis-à-vis (*a*) des métaux en fonction de la nature de ceux-ci, de leur concentration, du pH et de la pureté du matériel enzymatique, (*b*) des réactifs des groupes thiols, (*c*) des complexants des métaux.

I. — Spécificité amino-carboxypeptidasique

Nous avons déjà vu (chap. I, tabl. 2) que les activités dipeptidasiques AG et GG des extraits bruts, sont fortement inhibées par le blocage des groupes polaires aminés ou carboxyliques de ces substrats.

La spécificité amino-carboxypeptidasique de la fraction dipeptidasique a été vérifiée sur un matériel enzymatique débarrassé de 95 p. 100 des protéines, 90 p. 100 des polysaccharides et des impuretés nucléiques (d 280/260 mμ = 1,5), par chromatographie de E_3 sur hydroxylapatite, l'amino-carboxypeptidase étant éluée selon un gradient (tampon phosphate 0,25 mol pH 8,0 dans 100 ml du même tampon 0,001 mol) et recueillie dans un volume de 25 ml du 17^e au 42^e ml d'effluent.

TABLEAU 26

Spécificité de la fraction dipeptidasique

Substrat	Durée de l'hydrolyse (minutes)	Micromolécules hydrolysées	Micromolécules hydrolysées par minute
dl-alanylglycine	30	16,5	0,55
Glycylglycine	35	12,5	0,35
dl-leucylglycylglycine	60	0	0
AG amide	120	2,5	0,020
CBZ AG	180	traces	
CBZ AG amide	180		
GG amide	150	2,5	0,016
GG éthyl-ester	120	traces	
CBZ GG	180		
Chloracétyl GG	120		
CBZ GG amide	180		
l-leucyglycine	35	10	0,28
d-leucylglycine	120	traces	
Glycyl *l*-asparagine	45	7,5	0,16
Glycyl *d*-asparagine	120	0	0

— La fraction isolée présente bien la spécificité amino-carboxypeptidasique puisqu'elle exige la présence simultanée dans le substrat d'un α-NH_2 et α-COOH libres comme le montre son activité nulle vis-à-vis des dipeptides substitués correspondant à l'alanylglycine et à la glycylglycine.

Elle présente de plus une stéréospécificité *l* pour les deux acides aminés constitutifs du substrat : la *d*-LG et la glycyl-*d*-asparagine ne sont pas hydrolysées.

TABLEAU 27

Activités de l'amino-carboxypeptidase vis-à-vis de quelques dipeptides

Substrats	Micromolécules de substrat hydrolysées par minute	
	en absence de Co^{++}	en présence de Co^{++} 0,001 mol
dl-alanylglycine	0,50	0,10
dl-alanylleucine	0,40	0,08
dl-alanylphénylalanine	0,04	0,11
dl-alanylasparagine	0,20	0,10
dl-alanylsérine	0,11	0,13
Glycylglycine	0,07	0,37
Glycyl *l*-leucine	1,5	0,20
Glycyl *dl*-phénylalanine	0,44	0,22
Glycyl *l*-asparagine	0,32	0,44
Glycyl *dl*-sérine	0,22	0,66
Glycyl alanine	0,40	0,37
Glycyl thréonine	0,28	0,44
Glycyl *l*-aspartique	traces	
Glycyl *d*-aspartique	traces	

A l'exception des acides glycyl *l* et *d* aspartique, l'enzyme hydrolyse tous les dipeptides testés aussi bien les dipeptides alcools qu'aromatiques et les glycylpeptides plus rapidement que les alanyl peptides correspondants l'alanylglycine exceptée.

Les dipeptides les plus rapidement hydrolysés sont dans l'ordre décroissant glycylleucine, alanylglycine, glycylphénylalanine, glycylalanine, alanylleucine, glycylasparagine.

Nous avons vérifié que les dipeptides hydrolysés par la fraction dipeptidasique concentrée, le sont également par les extraits bruts et dans le même ordre de vitesse, il n'y a donc pas, au cours de la purification, fractionnement du matériel dipeptidasique en enzymes spécifiques des dipeptides étudiés.

— La glycylglycine n'est pas le seul dipeptide dont l'hydrolyse est activée par le cobalt ; il en est de même pour l'hydrolyse de la glycylsérine, l'alanylphénylalanine et la glycylthréonine.

— Si nous comparons les vitesses d'hydrolyse de la glycylglycine (0,07), de la glycylalanine (0,40) et de la glycylleucine (1,5), tout se passe comme si la substitution d'un α-H, de l'acide aminé participant par son groupe NH_2 à la liaison peptidique, par un radical méthyl ou isopropyl favorisait l'hydrolyse du dipeptide, il ne paraît

pas en être de même si l'acide aminé participe à la liaison peptidique par son groupe COOH : glycylglycine (0,07), alanylglycine (0,50), leucylglycine (0,28).

Une simple inversion de l'acide aminé dans le substrat peut faire varier considérablement la vitesse d'hydrolyse : glycylleucine (1,5), leucylglycine (0,28) ou non : alanylglycine (0,50), glycylalanine (0,40).

– Si nous comparons enfin les vitesses d'hydrolyse de l'acide glycyl-*l*-aspartique (0) et de la glycyl-*l*-asparagine (0,32), tout se passe comme si le COOH latéral libre de l'acide aspartique inhibait l'hydrolyse de ce dipeptide.

Ces quelques exemples montrent l'influence des chaînes latérales et de leur position d'un côté ou de l'autre de la liaison peptidique sensible, sur l'hydrolyse de celle-ci.

II. — pH optimal

N'a pas fait l'objet de recherche pour le situer avec précision ; rappelons que les essais réalisés sur des extraits enzymatiques obtenus après précipitation fractionnée nous ont permis de le situer aux environs de 8,0 pour l'alanylglycine et la glycylleucine et de 7,5 pour la glycylglycine.

Le pH optimal de l'amino-carboxypeptidase se situe dans une zone très différente du pH optimal des activités endopeptidasiques (CBZ AG amide, 6,0), carboxypeptidasiques (CBZ AG entre 5,0 et 6,0) et plus proche de celui des activités aminopeptidasiques (LGG, GG amide 7,0) et AG amide (entre 7,0 et 8,0).

III. — Stabilité

— Pour une température donnée, la stabilité de l'amino-carboxypeptidase dépend du pH et du temps de conservation à cette température. (fig. 17).

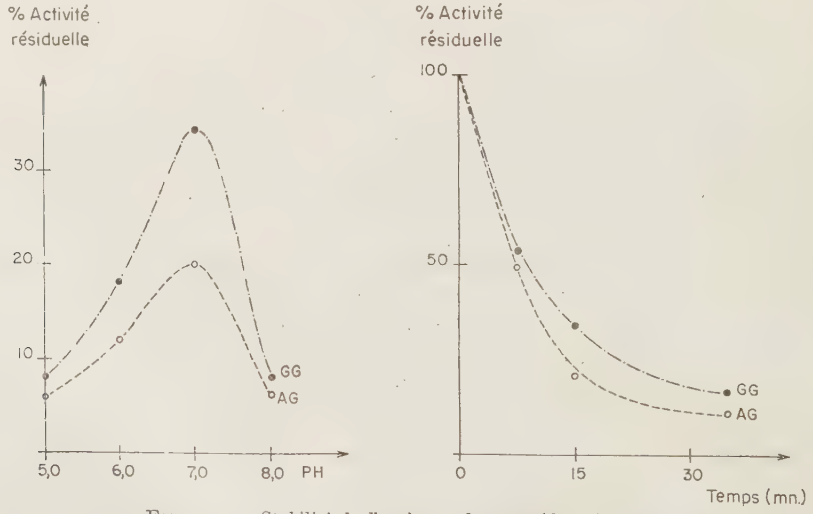


Fig. 17. — *Stabilité de l'amino-carboxypeptidase à 50°C*

L'enzyme (extrait dialysé débarrassé de ses impuretés nucléiques) est incubé 15 minutes à 50°C au bain-marie aux pH 5,0 6,0 7,0 8,0 (diagramme I) et au pH optimal de stabilité pendant 7,5 15 et 35 minutes (diagramme II).

C'est à pH 7,0 qu'elle est la plus stable (diagr. 1) ; mais après 35 minutes d'incubation à ce pH de stabilité maximale, elle perd déjà à 50°C, 80 à 90 p. 100 de ses activités AG et GG (diagr. 2).

Elle est très labile comparativement aux activités aminopeptidasique LGG et carboxypeptidasique Cl Ty qui, à leur pH optimal de stabilité 7,0 également, ne perdent que 20 à 25 p. 100 de leur activité après 70 minutes à la même température (tabl. 7, p. 44).

C'est pour le même pH que les activités AG et GG sont les plus stables, cependant dans tous les cas les activités GG paraissent plus résistantes : le rapport AG/GG varie de 2,9 dans le témoin, à 1,7 dans l'extrait incubé 15 minutes à pH 7,0.

— A 40°C on n'observe pratiquement pas de pertes d'activités des extraits bruts pendant les trois premières heures d'incubation à pH 7,5.

— Aux environs de 0°C à pH 7,5, les extraits bruts ou leurs dialysats sont stables pendant 3 à 4 jours, il n'en est plus de même des extraits E_4 qui perdent dans les mêmes conditions 40 à 60 p. 100 de leurs activités AG et GG. (Nous avons vérifié aussi qu'une bonne réfrigération des colonnes était indispensable lors des chromatographies sur DEAE-cellulose ou hydroxylapatite.)

En définitive, l'amino-carboxypeptidase est beaucoup moins stable que l'amino et la carboxypeptidase ; sa stabilité dépend du pH, de la température, et du degré de purification de l'enzyme.

IV. — Action des métaux

L'action des métaux sur l'amino-carboxypeptidase de la levure n'a pas fait jusqu'ici l'objet de recherches systématiques, de plus, les résultats obtenus par Johnson et Berger (1939), Maschmann (1943), Schales et Roux (1950) sont quelque peu embrouillés et incertains en raison du choix le plus souvent, de la leucylglycine comme substrat spécifique de l'enzyme et de simples extraits bruts (autolysats) comme matériel enzymatique.

Nous en avons repris l'étude sur un matériel purifié davantage et sur un plus grand nombre de substrats dans le but d'apprécier le rôle des métaux dans l'activité de l'amino-carboxypeptidase et de différencier ses activités entre elles.

L'influence des métaux suivant leur concentration, le pH, et le degré de purification de l'enzyme a été précisée.

Techniques expérimentales.

Matériel enzymatique : (a) précipité acétonique des extraits enzymatiques dialysés et débarrassés des impuretés nucléiques par percolation sur Dowex 1 × 8 et (b) extrait enzymatique au stade 4 après élimination de l'aminopeptidase, des polysaccharides et purifié 20 fois environ par rapport aux protéines.

L'enzyme est préincubé avec le métal pendant 20 minutes à la température de 40°C au pH désiré puis ajouté au substrat tamponné. Les concentrations en métal indiquées sur les tableaux sont les concentrations moléculaires dans le mélange Enzyme-Substrat-Effecteur.

Résultats obtenus

a) *Action des métaux sur les activités dipeptidasiques.*

Tous les métaux testés, Mg^{++} excepté, inhibent les activités dipeptidasiques à l'exception de l'activité GG.

TABLEAU 28

	Activités rapportées au témoin			
	LG	AG	GL	GG
Témoin sans effecteur ...	100	100	100	100
Co^{++} 10^{-3} mol	80	30	37	1 870
Mn^{++} 10^{-3} mol	54	30	43	275
Fe^{++} 10^{-3} mol	58	53	51	550
Zn^{++} 10^{-3} mol	35	5	11	75
Cu^{++} 10^{-3} mol		30		100
Mg^{++} 10^{-3} mol	94	125		168
Ca^{++} 10^{-3} mol	82		70	

b) *Influence de la concentration en métal.*

Cu^{++} et Zn^{++} sont sans effet sur GG à la dose où ils inhibent AG à 70 %

TABLEAU 29

Métal — Concentration (mol)	Micromolécules de substrat hydrolysées par minute	
	AG	GG
Témoin : sans effecteur	0,56	0,016
10^{-5}	0,52	
Cu^{++} 10^{-4}	0,38	
10^{-3}	0,17	0,016
10^{-5}	0,46	
Zn^{++} 10^{-4}	0,17	0,016
10^{-3}	0,03	0,012
10^{-5}	0,33	0,027
Mn^{++} 10^{-4}	0,17	0,033
10^{-3}	0,17	0,044
Co^{++} 10^{-4}	0,28	
10^{-3}	0,18	0,30
10^{-5}	0,50	0,055
Fe^{++} 10^{-4}	0,37	0,055
10^{-3}	0,30	0,088
Mg^{++} 10^{-4}	0,57	
10^{-3}	0,70	0,027

c) *Influence du pH.*

Le pH, dans les limites testées, ne modifie pas l'action des métaux sur les activités AG et GG. Pour GG, l'activation maximale se situe à pH 7,5 pour les trois métaux activateurs.

TABLEAU 30

Micromolécules de substrat hydrolysées par minute
(concentration en métal 10^{-4} mol).

pH	AG				GG				
	Témoin sans effecteur	Co	Fe	Zn	Témoin sans effecteur	Co	Fe	Mn	Zn
6,0					0,020	0,33	0,055	0,041	0,012
7,0	0,51	0,46	0,53	0,18	0,024	0,46	0,072	0,050	0,012
7,5	0,52	0,38	0,50	0,18	0,033	0,66	0,077	0,058	0,020
8,0	0,52	0,35	0,50	0,21	0,033	0,28	0,027	0,033	0,020

d) *Influence de la purification sur l'action des métaux.*

La purification de l'enzyme entraîne une activation moindre de GG et une inhibition moindre de AG en ce qui concerne Zn tout au moins. Dans le cas d'un enzyme à métal faiblement lié, on aurait pu s'attendre à une augmentation de l'activation.

TABLEAU 31

	Taux d'inhibition de AG (%)		Taux d'activation de GG (%)	
	Sur l'enzyme non purifié (1)	Sur l'enzyme purifié (2)	Sur l'enzyme non purifié	Sur l'enzyme purifié
Mn^{++} 10^{-4} mol	70	68		
Zn 10^{-4} mol	70	12		
Fe 10^{-4} mol	34	37		
Co 10^{-4} mol	62	37		
10^{-3} mol			1 400	870

(1) Extrait enzymatique dialysé, débarrassé des impuretés nucléiques.

(2) Fraction amino-carboxypeptidasique débarrassée de l'aminopeptidase, des acides nucléiques, des polysaccharides et de 90 p. 100 des protéines inactives.

e) *Action du cobalt sur les activités peptidasiques de l'amino-carboxypeptidase purifiée* (1)

La glycylglycine n'est pas le seul dipeptide dont l'hydrolyse est activée par le cobalt, celle de la glycylsérine en particulier.

TABLEAU 32

	Micromolécules hydrolysées par minute		
	Sans effecteur	Co 10^{-3} mol	
Glycylleucine	0,76	0,10	Inhibition
Alanylglycine	0,25	0,05	
Alanylleucine	0,20	0,04	
Alanylasparagine	0,10	0,05	
Glycylphénylalanine	0,20	0,11	
Leucylglycine	0,10	0,06	
Glycylalanine	0,20	0,19	
Glycylglycine	0,03	0,18	Activation
Glycylsérine	0,11	0,33	
Alanylphénylalanine	0,02	0,055	
Glycylthréonine	0,14	0,22	
Alanylsérine	0,05	0,07	
Glycylasparagine	0,16	0,22	

(1) Préparation purifiée du tableau précédent.

V. — Action des réactifs des groupes thiols

a) *Action du plomb, de l'argent et du mercure*

A 10^{-4} mol, Pb, Ag, Hg, inhibent les activité AG à 95 p. 100 et GG à 40-50 p. 100. Les différences entre AG et GG constatées pour les autres métaux persistent mais moins nettement.

TABLEAU 33

	Micromolécules de substrat hydrolysées par minute	
	AG	GG
Témoin sans effecteur	0,7	0,062
Pb^{++} 10^{-5}	0,15	0,036
10^{-4}	0,02	0,031
Ag^{++} 10^{-5}	0,30	0,036
10^{-4}	0,04	0,035
Hg^{++} 10^{-5}	2,00	0,120
10^{-4}	0,04	0,036

Il est curieux de constater que le mercure à la concentration de 10^{-5} mol est un fort activateur des activités AG et GG. Nous avons vérifié qu'à cette concentration les autres métaux Zn, Fe, Mn, étaient sans effet ou inhibiteurs, à l'exception de Co déjà activateur de GG. Nous avons vérifié aussi que ce n'était pas un accident dû à une impureté d'un réactif.

b) *Action de l'iode et du* p-*chloromercuribenzoate*

L'iode est un inhibiteur puissant de AG, moindre de GG, le *p*-chloromercuribenzoate de sodium, réactif spécifique des groupes thiols, est également inhibiteur (aux différents pH testés : 6,5-7,5 et 8,5).

TABLEAU 34

	Micromolécules de substrat hydrolysées par minute	
	AG	GG
Témoin sans effecteur.....	0,7	0,062
Iode 10^{-5} mol	0,07	0,031
Iode 10^{-4} mol	0,01	
PCMB 10^{-5} mol.....	0,24	0,026
PCMB 10^{-4} mol.....	0,18	0,018
Ferricyanure de K 10^{-3} mol	0,70	0,062
Ferricyanure de K 10^{-2} mol	0,72	0,064
Iodacétamide 10^{-3} mol.....	0,70	0,062
Iodacétamide 10^{-2} mol.....	0,50	0,044

L'élimination de ces réactifs, par une dialyse de 30 heures de l'enzyme inhibé, ne restaure pas son activité; par contre celle-ci est restaurée partiellement (15 à 20 p. 100 et 75 p. 100 dans le cas respectivement de l'enzyme inhibé par l'iode et par PCMB) par la cystéine qui est cependant un inhibiteur.

Les fonctions thiols sont donc bien impliquées dans les sites actifs de l'aminocarboxypeptidase. Mais l'inhibition nulle par un oxydant doux (le ferricyanure de potassium) ou très faible par l'iodo-acétamide indique que les groupes SH essentiels ne sont pas libres mais plus ou moins masqués.

L'oxydation de ces groupes par l'iode entraîne une modification de la solubilité de l'enzyme dans l'alcool, indiquant une modification de la structure de l'enzyme.

Discussion

1. *Activation différentielle par les métaux.*

Les résultats du tableau 28 mettent clairement en évidence le comportement des activités LG, AG, GL et GG vis-à-vis des métaux testés, elles sont toutes inhibées à l'exception de l'activité GG.

Celle-ci se différencie nettement des autres par sa forte activation par le cobalt, puis le fer et le manganèse. Le cuivre et le zinc sont sans effet sur elle à la dose où ils inhibent l'activité AG à 70 p. 100 (tabl. 29).

Les activités AG et GL se comportent de façon parallèle vis-à-vis du zinc plus inhibiteur que Co et Mn puis Fe.

L'activité LG se différencie des activités AG et GL par une moindre inhibition par Co et Zn, elle se rapproche en cela davantage des activités aminopeptidasiques que dipeptidasiques.

En définitive, si l'on ne tient compte que des activités dipeptidasiques autres que LG (qui est aussi une activité aminopeptidasique, voir chap. I), elles se classent en deux groupes : l'un comprenant les activités AG et GL fortement inhibées par Zn, Co, Mn, Fe, l'autre, l'activité GG, fortement activée par Co, Fe puis Mn.

Ces inhibitions ou activations s'observent quel que soit le pH dans les limites testées (tabl. 30) et le degré de purification (tabl. 31 et 32).

GG n'est cependant pas le seul dipeptide dont l'hydrolyse est activée par le cobalt (tabl. 32).

L'activation de GG par Co et Mn avait été déjà constatée par MASCHMANN et plus récemment par NISHI sur l'amino-carboxypeptidase de levure, et par SMITH. C'est un fait important puisque nous l'avons vu, c'est essentiellement sur la base de cette activation différentielle que ces auteurs ont admis l'existence d'une amino-carboxypeptidase, activable par le cobalt dont le substrat spécifique serait la glycylglycine.

L'activation d'autre dipeptides par ce métal indique qu'il convient d'être prudent avant de restreindre la spécificité de cet enzyme.

Si ce critère de l'action des métaux était suffisant pour déterminer l'individualité d'un enzyme, ces résultats montrent qu'il faudrait alors admettre l'existence, dans la fraction dipeptidasique des extraits de *Saccharomyces cerevisiae ellipsoïdeus*, de deux amino-carboxypeptidases hydrolysant l'une AG et inhibée par Co, Mn, Fe, l'autre, GG et activée par ces métaux inhibiteurs de la première.

Vis-à-vis des métaux, le matériel amino-carboxypeptidasique de *Saccharomyces cerevisiae ellipsoïdeus*, se comporte de façon analogue à celui de nombreux autres matériels biologiques.

2. *Présence de groupes thiols actifs parmi les centres actifs.*

L'inhibition de l'activité AG par le fer, le cuivre, le zinc, le manganèse et plus encore le plomb, l'argent et le mercure, suggère que l'enzyme hydrolysant AG possède des groupes thiols parmi ses centres actifs.

Cette hypothèse est renforcée par l'action inhibitrice non compétitive de l'iode qui oxyde les groupes thiols en disulfure et vérifiée par l'action inhibitrice également non compétitive du *p*-chloromercuribenzoate, réactif spécifique de ces groupes (tabl. 34).

L'enzyme hydrolysant GG présente aussi ces caractères, mais moins nettement : il est inhibé mais à un degré moindre, seulement par Pb, Ag, Hg, de plus son taux d'inhibition par l'iode est aussi plus faible. Les groupes thiols de cet enzyme auraient donc une réactivité plus faible que ceux de l'enzyme hydrolysant AG.

L'activation de AG et GG par les faibles concentrations de Hg^{++} suivie d'une inhibition assez remarquable et paraît spécifique de ce métal ; nous ne

l'avons constatée avec aucun des autres métaux testés (Zn, Mn, Fe, Pb, Ag) utilisés à une concentration identique ou inférieure. Nishi l'a signalé aussi dans ses travaux sur la « GG dipeptidase » de la levure (1958).

En résumé, *deux faits essentiels sont à retenir de ces résultats : le premier c'est l'existence de groupes thiols parmi les centres actifs du matériel amino-carboxypeptidasique, le second c'est la différenciation de ses activités en deux groupes, l'un inhibé par les métaux, l'autre au contraire activé (l'activité GG étant la plus représentative de ce dernier) comme si le matériel isolé n'était pas dipeptidasiquement homogène.*

VI. — Action des complexants des métaux

La plupart des amino-carboxypeptidases et le matériel dipeptidasique de *Saccharomyces cerevisiae* sont inhibés par les complexants des métaux. Nous avons vu que nous ne connaissions pas les causes de cette inhibition qui ne peut être acceptée a *priori* comme le résultat d'une interaction avec un métal nécessaire à l'activité de l'enzyme. Nous avons donc entrepris l'étude de l'action de ces réactifs sur l'amino-carboxypeptidase de *Saccharomyces cerevisiae ellipsoïdeus* de façon à nous rendre compte si, dans le cas d'une inhibition, cette inhibition était bien le résultat d'une coordination de l'agent complexant avec un cofacteur métallique.

Nous avons aussi tenté de restaurer, par différents métaux, l'activité de l'enzyme privé de son métal de façon à apprécier son affinité pour ces métaux et voir s'ils n'induisaient pas, comme chez la carboxypeptidase pancréatique, un changement de spécificité.

Techniques expérimentales.

Matériel enzymatique : précipité acétonique des extraits enzymatiques dialysés et débarrassés des impuretés nucléiques par percolation sur Dowex 1 × 8. Nous n'avons pu utiliser les extraits purifiés davantage par chromatographie sur DEAE-cellulose ou hydroxylapatite (E_4) en raison des pertes importantes en activités provoquées par la dialyse à ce stade de la purification.

Les techniques utilisées sont celles décrites par Vallee (1955), (Vallee et *al.*, 1960) :

1. L'inhibition non compétitive par les complexants a été vérifiée (*a*) en mélangeant en proportion équimoléculaire le complexant et le métal testé avant son addition à l'enzyme, (*b*) en ajoutant le métal à l'enzyme additionné du complexant ; cette dernière technique permettant en outre de se rendre compte dans une certaine mesure de la réversibilité de la combinaison du métal avec l'enzyme.

2. L'inhibition étant maximale à pH 8,0, toutes les expériences ont été conduites en milieu tamponné *Tris* HCl 0,02 mol à ce pH. De même les conditions optimales de réactivation par les métaux, de l'enzyme inhibé ont été précisées : 20 à 25 minutes d'incubation à 40°C du métal avec l'enzyme inhibé par le complexant.

3. Préparation de l'apoenzyme : l'enzyme est privé de son métal par action d'un complexant suivie d'une double dialyse d'abord contre ce complexant puis un tampon : (*a*) *Élimination du métal* : 10 ml OP × 10^{-3} mol (1), tampon *Tris* 0,05 mol, pH 8,0 contenant 5 mg/ml d'enzyme natif,

(1) La concentration en OP est mesurée au préalable ; elle a été calculée de façon à réaliser d'une part une inhibition partielle (2 × 10^{-3} Mol) et d'autre part une inhibition totale (6 × 10^{-3} Mol) dans les expériences I et II décrites plus loin. D'autre part dans la deuxième expérience, de façon à nous prémunir contre toute trace éventuelle de métaux, le tampon Tris d'élimination du complexant a été additionné de OP à la concentration de 0,5 × 10^{-6} Mol à laquelle aucune inhibition de l'amino-carboxypeptidase n'était observée.
Un témoin est dialysé dans les mêmes conditions sans OP.

sont dialysés 24 heures à 0°C contre 100 ml du même tampon *Tris*, OP. (*b*) *Élimination de OP* : par 4 changements de 200 ml de tampon *Tris* 0,05 mol pH 8,0 à la même température, durée de la dialyse 32 heures.

4. L'absence de métaux a été vérifiée dans les tampons, l'acide chlorhydrique et les substrats, L'eau désionisée, redistillée ainsi que les divers réactifs étaient stockés dans des récipients de polyéthylène préalablement lavés à HCl 2 N puis à une solution d'orthophénantroline (OP) et rincés plusieurs fois à l'eau désionisée, les sacs à dialyse étaient mis à tremper dans une solution de OP puis OP éliminé à l'eau désionisée.

Les concentrations en complexant figurant sur les tableaux ou graphiques correspondent à leur concentration dans le mélange d'incubation enzyme-substrat-effecteur.

Résultats obtenus

a) *Effet des complexants et de leur concentration.*

Les polyphosphates et métaphosphates sont, selon la concentration, « activateurs » puis inhibiteurs de l'activité AG (fig. 18).

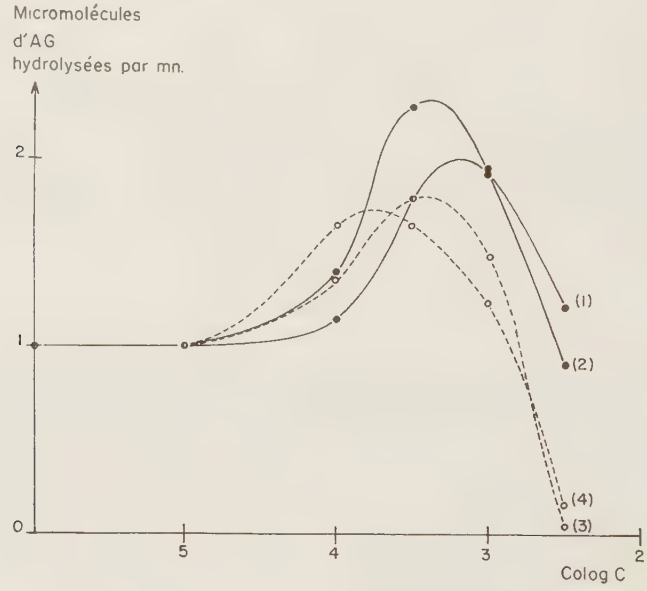


FIG. 18. — *Effet des polyphosphates sur l'hydrolyse de AG*

(1) monométaphosphate ; (2) trimétaphosphate ; (3) pyrophosphate ; (4) tripolyphosphate.

Les premiers se distinguent des seconds par leur pouvoir activateur plus faible et surtout par leur fort pouvoir inhibiteur pour des concentrations où la plupart des métaphosphates sont encore fortement activateurs (tableau 15).

Il faut rechercher vraisemblablement l'explication de ces différences dans l'activation et l'inhibition de AG, par ces deux groupes de phosphates, dans le fait que les métaphosphates ont un pouvoir complexant moins élevé que les polyphosphates.

La 1,10-phénantroline (OP), la 8-hydroxyquinoléine (8-OHQ) et l'éthylènediaminetétracétate de sodium (EDTA), sont comme les polyphosphates, activateurs

puis inhibiteurs de l'activité AG (fig. 19). Il en est de même d'ailleurs pour les activités GG et GL complexées avec EDTA (voir fig. 2, p. 40) et nous avons vérifié aussi qu'il en était de même pour l'activité GL complexée avec OP.

TABLEAU 35

	Activités AG en présence de phosphates, rapportées à l'activité sans effecteur			
	Concentration en effecteur	Activité	Concentration en effecteur	Activité
Témoin	0	100	0	100
Orthophosphate (1)	10^{-3} mol	110	5×10^{-3} mol	110
Monométaphosphate (2) .	—	213	—	169
Trimétaphosphate (3)	—	190	—	90
Hexamétaphosphate (1) ..	*	233	—	144
Pyrophosphate (1)	—	148	—	11
Tripolyphosphate (3)	—	120	—	16
Tétrapolyphosphate (3) ..	*	123	—	24

(1) Merk ou Prolabo, (2) British Drug House, (3) fournis par le Pr Ebel.
* Concentration calculée comme si ces phosphates étaient bien un hexa- et un tétrapolyphosphate.

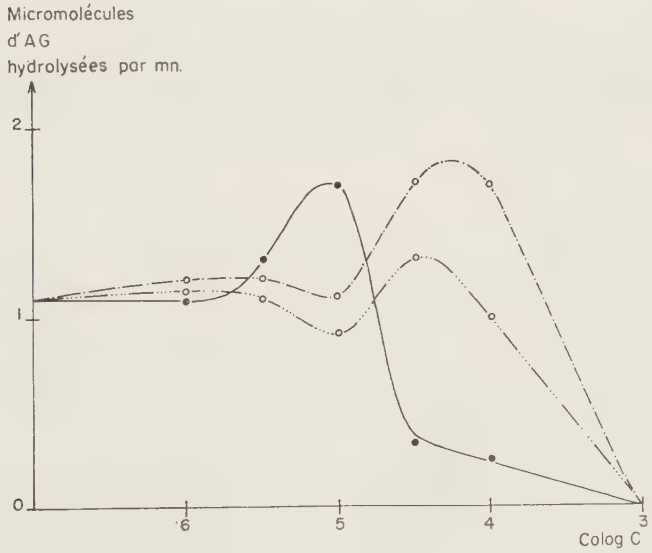


Fig. 19. — *Effet des complexants sur l'activité AG en fonction de leur concentration*
—·—·— (8 OHQ), ———— (EDTA), —···—··— (OP)

L'action de ces complexants sur l'amino-carboxypeptidase est tout à fait différente de celle qu'ils exercent sur l'aminopeptidase (fig. 2, p. 40), la leucine-aminopeptidase du rein de porc (Smith et Spackmann, 1955) et la carboxypeptidase pan-

créatique (Vallee et Neurath, 1955) dont l'inhibition n'est pas précédée d'une activation pour les faibles concentrations en réactif.

L'allure originale en cloche de ces courbes d'action des complexants en fonction de leur concentration sera discutée plus loin. L'important ici est la mise en évidence de la forte inhibition qu'ils provoquent qui suggère un rôle essentiel des métaux dans l'activité AG de l'amino-carboxypeptidase de *Saccharomyces cerevisiae ellipsoïdeus*, rôle qui n'était pas prévisible étant donnée la forte inhibition de cette activité par les métaux.

Remarque. D'autres réactifs des métaux sont également inhibiteurs.

TABLEAU 36

Inhibition par la cysteine et SNa_2

	Micromolécules de substrat hydrolysées	
	AG	GG (sans Co)
Témoin	1,20	0,10
Cystéine 10^{-3} mol	0,70	0,07
SNa_2 10^{-3} mol	0,07	0,05

b) *Effet de la durée et de la température d'incubation avec le complexant.*

L'inhibition de l'amino-carboxypepetidase (fig. 20) est : (*a*) *très rapide* puisque après cinq minutes d'incubation avec le complexant on atteint pratiquement le niveau d'inhibition maximal correspondant à la concentration en OP choisie ; la courbe

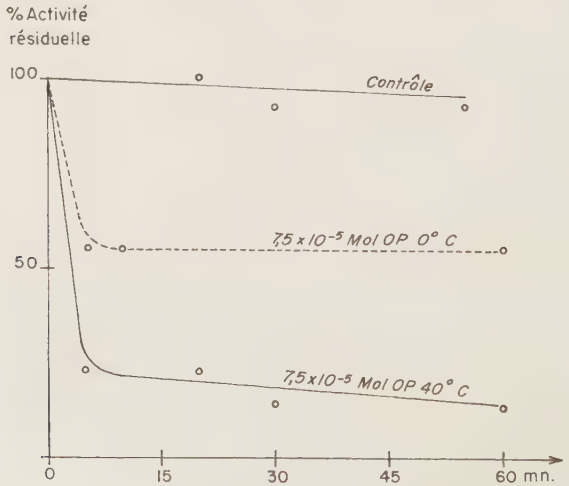


Fig. 20. — *Influence de la température et du temps sur l'inhibition de l'amino-carboxypeptidase par OP 7,5 × 10^{-3} mol.*

L'enzyme est préincubé avec le complexant à 0°C et 40°C. A des intervalles de temps mesurés, une partie aliquote est prélevée et mise en présence du substrat.

d'inhibition en fonction du temps est analogue à celle de la carboxypeptidase pancréatique (Vallee, 1955), (*b*) *fonction de la température* : à 0°C, le taux d'inhibition provoquée par OP 7,5 × 10^{-5} Mol est deux fois moins élevé qu'à 40°C. L'inhibition de l'enzyme est donc beaucoup plus fonction de la température que du temps. Nous avons vérifié aussi qu'elle était *fonction du pH*, le pH optimal d'inhibition est de 8,0.

Ces résultats sont d'une grande importance pratique dans la détermination des doses de complexant nécessaires pour la préparation de l'apo-enzyme réalisée à 0°C.

c) *Nature de l'inhibition.*

Action non compétitive des complexants. — Le complexant avant d'être incubé avec l'enzyme est « neutralisé » par une quantité équimoléculaire de métal.

La 1,10-phénantroline qui provoque le maximum d'inhibition a été choisie comme complexant et combinée à Fe^{++}, Zn^{++}, Mn^{++}, Mg^{++} ; soit les combinaisons que nous désignons par OP (Fe), OP (Zn), OP (Mn), OP (Mg).

TABLEAU 37

Effet des complexants « neutralisés » par les métaux sur l'activité AG.

Traitement	Micromolécules AG hydrolysées/mn	P. 100 activités du témoin
Aucun	0,44	100
OP 5 × 10^{-4} mol	0,01	2
OP (Fe) 5 × 10^{-4} mol	0,40	90
OP (Zn) 5 × 10^{-4} mol	0,20	45
OP (Mn) 5 × 10^{-4} mol	0,09	20
OP (Mg) 5 × 10^{-4} mol	0,01	2

La 1,10-phénantroline n'a pas d'effet inhibiteur si avant d'être ajoutée à l'enzyme elle est combinée avec Fe^{++}. Elle agit donc bien en tant que complexant d'un métal nécessaire à l'activité de l'amino-carboxypeptidase et non par un effet compétitif ou par interaction sur le substrat ou l'enzyme.

Le même effet s'observe avec Zn et Mn mais moins marqué en raison vraisemblablement de la moindre affinité de OP pour ces cations.

Avec OP (Mg) la perte d'activité est la même qu'avec OP. Il s'ensuit que la 1,10-phénantroline ne forme pas de complexe avec Mg dans ces conditions expérimentales et que ce cation n'est pas le métal nécessaire à l'activité de l'enzyme.

Réversibilité de l'inhibition. — A l'enzyme inhibée par OP, soit (OPE), on ajoute FE^{++}, Zn^{++}, Co^{++}, Mn^{++} et Ni^{++} avant l'addition du substrat (tableau 38).

L'activité de l'amino-carboxypeptidase inhibée par OP est partiellement restaurée par Fe^{++}, Co^{++}, Zn^{++}, Ni^{++} bien que ces métaux soient inhibiteurs à la concentration utilisée (tabl. 39).

La restauration de l'activité par ces métaux est donc due à un effet compétitif de ceux-ci et du métal de l'enzyme avec le complexant et l'enzyme.

TABLEAU 38

Restauration par différents cations de l'activité de l'amino-carboxypeptidase inhibée par OP

Traitement	Micromolécules de substrats hydrolysées par minute			P. 100 de restauration des activités		
	AG	GL	GG	AG	GL	GG
Aucun	0,50	1,0	0,10			
OPE (OP 5×10^{-4} mol)	0,01	0,01	0,02			
OPE + Fe^{++} 5×10^{-4} mol	0,35	0,40	0,16	70	40	160
OPE + Zn^{++} 5×10^{-4} mol	0,25			50		
OPE + Co^{++} 5×10^{-4} mol	0,30			60		
OPE + Ni^{++} 5×10^{-4} mol	0,24			48		
OPE + Mn^{++} 5×10^{-4} mol	0,06			12		

L'enzyme est d'abord incubé 1 heure à 0°C avec OP 5×10^{-3} mol puis on ajoute les métaux 5×10^{-3} mol. Après 20 minutes de séjour à 40° C le substrat est ajouté.

TABLEAU 39

Traitement	Micromolécules AG hydrolysées/mn	P. 100 d'inhibition
Aucun	0,50	
Fe^{++} 5×10^{-4} mol	0,40	20
Zn^{++} 5×10^{-4} mol	0,09	82
Co^{++} 5×10^{-4} mol	0,21	58
Ni^{++} 5×10^{-4} mol	0,36	28
Nn^{++} 5×10^{-4} mol	0,10	80

Ces résultats mettent clairement en évidence le rôle essentiel d'un métal dans l'activité de l'amino-carboxypeptidase. L'inhibition non compétitive et réversible est bien le résultat d'une coordination de ces complexants avec un cofacteur métallique.

Elle peut être due (*a*) à la *formation d'un complexe mixte* suivant E Me + $OP_n \rightleftarrows$ (E Me) OP_n (schéma I) dans lequel la sphère de coordination du métal Me est saturée par OP et E. L'addition d'un métal Me' à l'enzyme inhibé entraîne la restauration de son activité par dissociation du complexe suivant : (E Me) OP_n + Me' $\rightleftarrows$ E Me + OP_n ME', le métal Me restant lié à la protéine. (b) *à l'élimination du métal de l'enzyme* : E Me + $OP_n \underset{2}{\overset{1}{\rightleftarrows}}$ E + OP_n Me (schéma II) ; la restauration de l'activité par addition de Me' implique dans ce cas l'aptitude de l'apoprotéine E à se réassocier avec le métal Me.

L'addition d'un métal Me' conduit à déplacer la réaction d'équilibre dans le sens 2 si la constante d'affinité de OP pour Me' est plus grande que pour Me. Dans ces conditions, la restauration de l'activité par Me' n'implique nullement que ce métal soit nécessaire à l'activité de l'enzyme.

Quel que soit le schéma suivant lequel se réalise l'inhibition, les expériences décrites ne nous donnent donc aucune indication sur la nature du métal Me mais nous permettent de dire que *ce métal ou bien reste lié à l'apoenzyme ou bien forme avec lui un complexe dissociable.*

d) *Recherche de l'affinité de l'apoenzyme pour les métaux.*

L'enzyme est privé de son métal par action de OP suivie d'une double dialyse d'abord contre OP puis un tampon, suivant le protocole expérimental précisé plus haut.

Dans ces conditions on obtient, selon la concentration en OP utilisée, un enzyme partiellement inactivé (tabl. 40, expérience 1) ou en totalité (tabl. 40, expérience 2) donc partiellement ou en totalité privé de son métal. L'apoenzyme est ensuite incubé, avant d'être ajouté au substrat, avec différents métaux suivant les conditions expérimentales optimales de réactivation.

TABLEAU 40

Réactivation de l' « apoenzyme » par différents métaux

Traitement	Expérience I micromolécules hydrolysées par minute	Expérience II (1) micromolécules hydrolysées par minute	
	AG	GL	AG
Témoin : Enzyme native dialysée..	0,36	0,51	0,37
« Apoenzyme »	0,18	0,0	0,0
+ Fe^{++} 10^{-4} mol	0,25	0,06	
Zn^{++} 10^{-4} mol	0,09	0,10	
Co^{++} 10^{-4} mol	0,10	0,05	traces
Mn^{++} 10^{-4} mol	0,06	0,0	0,02
Ni^{++} 10^{-4} mol	0,21		
Cu^{++} 10^{-4} mol	0,12		

L'« apoenzyme » est incubé avec le métal pendant 20 minutes à 40°C à pH 8,0 *Tris* HCl 0,02 mol avant d'être ajouté au substrat.

(1) Dans cette expérience les métaux ont été testés aux autres concentrations suivantes sans plus de résultats : 5×10^{-6}, 10^{-5}, 5×10^{-5} et 10^{-3} mol.

L'enzyme partiellement privé de son métal, retrouve 60 à 70 p. 100 de son activité avec Fe et Ni ; mais totalement privé de son métal, il reste pratiquement inactif.

Il n'a donc pas été possible d'apprécier son affinité pour différents métaux et les modifications éventuelles de spécificité pouvant en résulter.

e) *Nature de la métalloaminocarboxypeptidase.*

Ces résultats sont cependant intéressants car, en fonction des données acquises au paragraphe précédent (*c*) nous savons que cette non restauration de l'activité de l'enzyme privé de son métal n'est pas due à une irréversibilité de la combinaison enzyme-métal. C'est donc que l'élimination du cofacteur métallique modifie profondément le comportement de l'enzyme au point que la réincorporation du métal dans son site originel n'est plus possible, tout au moins dans les conditions expérimentales adoptées.

C'est une des caractéristiques des « métalloenzymes » — on la rencontre en particulier chez l'anhydrase carbonique (Vallee, 1955), l'alcool-déshydrogénase de la levure (Vallee, 1960) — qui se différencient en cela des « complexes métal-enzymes ».

La restauration difficile sinon nulle de l'activité de l'amino-carboxypeptidase de *Saccharomyces cerevisiae ellipsoïdeus* suggère donc fortement qu'elle est du type « métalloenzyme ».

Son métal cofacteur est d'ailleurs fortement lié à la protéine puisqu'on n'observe pas de perte d'activités imputable à l'élimination d'un métal, au cours de sa purification, même en ce qui concerne l'activité GG pourtant activable par les métaux.

TABLEAU 41

Récupération des activités GG au cours d'une purification

	Unités GG (1)	U AG
Autolysat	18	150
Dialysat	64	180
Percolation sur Dowex 1 × 8	66	170
Chromatographie sur DEAE	25	70

(1) Mesurée en l'absence de cobalt.

Seuls, les complexants permettent de lui arracher son cofacteur métallique.

Nous n'avons cependant pas eu les moyens d'apporter la preuve formelle de sa nature métalloprotéique et de préciser l'espèce du métal cofacteur. Il aurait fallu pour cela suivre au cours de sa purification l'évolution de sa teneur en différents métaux afin d'établir éventuellement un rapport stœchiométrique entre l'un de ces métaux et la protéine enzymatique.

Discussion

La 1-10-phénantroline, la 8-hydroxy-quinoléine et le sel disodique de l'acide éthylènediaminetétracétique sont, à des degrés divers et selon la concentration, activateurs et inhibiteurs de l'amino-carboxypeptidase (fig. 19).

Les courbes d'activités en fonction de la concentration en complexant ont la même allure en cloche que celles obtenues avec les poly et métaphosphates (fig. 18) et n'ont rien de comparables avec les courbes d'inhibition de la carboxypeptidase pancréatique (Vallee et Neurath, 1955), de l'alcool déshydrogénase (Vallee et Hoch, 1955) et de l'aminopeptidase (fig. 2, page 40).

L'action de ces complexants est identique à celle des polyphosphates à ceci près qu'ils sont « activateurs » pour des concentrations molaires plus faibles, ce qui indique un pouvoir complexant plus élevé.

Il paraît donc évident que tous ces composés agissent de la même manière sur l'enzyme.

— *En ce qui concerne leur effet inhibiteur*, nos résultats expérimentaux prouvent qu'il s'agit de la complexion d'un cation indispensable à l'activité de l'amino-carboxypeptidase. L'inhibition peut être en effet supprimée : (*a*) par combinaison préalable du complexant avec un métal (tabl. 37) : OP combiné avec Fe^{++}, avant d'être ajoutée à l'enzyme, permet de conserver intacte son activité alors que OP seule, entraîne à la même concentration, une inhibition totale (*b*) par addition d'un métal à l'enzyme combiné au complexant (tabl. 38) : Fe^{++}, ajouté à l'enzyme inhibé, restaure à 70 p. 100 l'activité initiale.

L'inhibition par les complexants n'est donc pas due à un effet compétitif avec le substrat mais à leurs sites de chélation, de plus, l'inhibition est réversible.

Cependant, ces résultats de réactivation ne donnent aucune indication sur l'espèce du métal nécessaire à l'enzyme mais nous permettent de dire qu'il reste lié à la protéine enzymatique ou bien forme avec elle une combinaison dissociable.

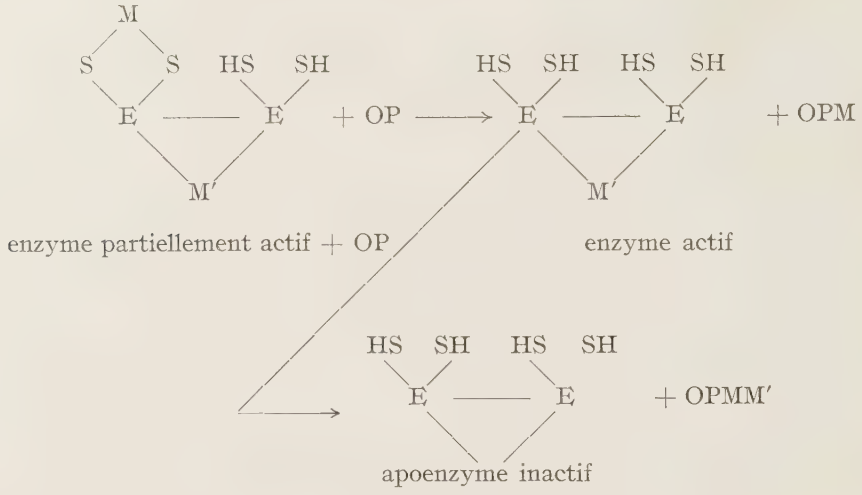
La nature métalloprotéique de l'amino-carboxypeptidase est fortement suggérée par le fait ; (*a*) que le métal nécessaire à son activité lui est fortement associé puisqu'il la suit au cours de sa purification durant laquelle aucune perte d'activité n'apparaît (tabl. 41) imputable à l'élimination d'un métal puisque au contraire les métaux sont encore inhibiteurs de la fraction dipeptidasique purifiée (tabl. 33) ; il a été vérifié aussi que la décationisation des extraits sur Dowex 50 n'entraînait pas de perte d'activité ; (*b*) que la restauration de l'activité de l'apoenzyme est difficile sinon nulle (tabl. 40). Pour cette raison l'affinité particulière de l'enzyme pour un métal n'a pas été déterminée.

Le métal lié à l'amino-carboxypeptidase n'a pas été identifié, cependant ce n'est pas le magnésium (tabl. 37) et la forte inhibition par SNa_2 de l'activité AG (tabl. 36) paraît indiquer qu'il fait partie des métaux lourds susceptibles de former des mercaptides.

— *En ce qui concerne l'effet activateur des complexants*, il n'a pas été étudié; mais le fait que les complexants n'agissent pas par intéraction avec le substrat ou l'enzyme, permet d'admettre que cet effet activateur est dû à la complexion de métaux bloquant certains centres actifs de l'enzyme.

Parmi ceux-ci figurent les groupes thiols (tabl. 34). Le double caractère de l'amino-carboxypeptidase d'être un enzyme à groupes thiols actifs et un métalloenzyme expliquerait bien le paradoxe de son inhibition à la fois par les métaux et les complexants, il expliquerait aussi l'allure originale en cloche de la courbe de son inactivation par les complexants qu'on ne retrouve pas pour l'aminopeptidase ;

suivant la concentration, les complexants libéreraient les groupes thiols actifs neutralisés par les métaux lourds (activation) puis arracheraient à l'enzyme son métal cofacteur (inhibition). Si on représente par E-E(1), M, M' et OP l'enzyme, ces métaux et le complexant, on pourrait représenter ce qui se passe de la façon suivante :



(1) *C'est pour rendre ce schéma plus clair que nous avons fait figurer l'enzyme par E-E, sans pour cela émettre une hypothèse sur sa structure.*

Nous n'avons pas vérifié cette hypothèse, bien entendu d'autres sites de l'enzyme, susceptibles d'être bloqués par les métaux, peuvent être concernés mais les groupes thiols sont de ceux qui représente une affinité particulière pour les métaux.

Ce double effet des complexants est possible parce que les constantes d'affinité de E et OP pour M et M' sont différentes. Il se peut aussi que l'on ait affaire à un seul et même métal présentant des affinités différentes pour les deux sites complexants de l'enzyme.

La mise en évidence de la nature thiométalloprotéique éclaire sous un jour nouveau l'activation de la glycylglycine par le cobalt qui sera discutée au prochain chapitre.

Résumé du chapitre III

Les faits essentiels suivants ont été mis en évidence dans ce chapitre :

— la spécificité amino-carboxypeptidasique du matériel dipeptidasique isolé et purifié ;

— la différenciation des activités dipeptidasiques en deux groupes l'un inhibé par le cobalt, l'autre au contraire activé, l'activité GG étant la plus représentative de ce dernier ;

— l'existence de groupes thiols parmi les centres actifs de l'amino-carboxypeptidase ;

— le caractère de métalloprotéine de l'enzyme ;

— le rôle complexe des métaux dans l'activité de l'enzyme puisqu'ils sont à la fois cofacteurs et inhibiteurs par blocage de sites actifs, vraisemblablement les groupes thiols ;

— l'inactivation irréversible de l'apoenzyme nous a cependant empêché d'aborder l'étude du rôle éventuel des métaux dans la spécificité de l'amino-carboxy-peptidase qui sera discuté au chapitre qui suit.

CHAPITRE IV

RECHERCHE DE LA PLURALITÉ ÉVENTUELLE DU MATÉRIEL AMINO-CARBOXYPEPTIDASIQUE ISOLÉ

Nous avons montré dans notre introduction qu'un des principaux problèmes reliés à l'étude des activités dipeptidasiques concerne la nature métalloprotéique éventuelle et l'individualité et la spécificité des enzymes responsables de ces activités.

Nos recherches ont mis en évidence que les activités dipeptidasiques de *Saccharomyces cerevisiae ellipsoïdeus* sont le fait d'aminopeptidase(s) et d'amino-carboxypeptidase(s) (chap. I) et que le matériel amino-carboxypeptidasique isolé, présente les caractères d'un métalloenzyme ; mais nous ne savons rien de l'individualité de ce matériel. Il paraît pourtant renfermer plusieurs enzymes : à côté d'activités dipeptidasiques fortement inhibées par le cobalt, l'activité AG notamment particulièrement abondante, il présente une activité GG au contraire fortement activée par ce métal.

Beaucoup de matériels biologiques autres que la levure possèdent aussi une telle activité GG pour laquelle l'existence d'une amino-carboxypeptidase spécifique a été avancée sur la base de cette activation différentielle. Cet enzyme a été appelé « glycylglycine dipeptidase » sans que pour autant aucune tentative n'ait été réalisée pour l'isoler.

Mais on peut se demander aussi si les métaux ne peuvent pas modifier la spécificité de l'amino-carboxypeptidase comme le laisseraient supposer les modifications de spécificité de la carboxypeptidase A induite par le remplacement sur l'apoenzyme du zinc par d'autres métaux.

Ainsi, ces divers matériels soulèvent-ils un problème général important : la question est en effet de savoir si les métaux induisent un changement de spécificité de l'amino-carboxypeptidase ou au contraire s'il s'agit bien d'enzymes distincts.

Nous avons tenté d'apporter des éléments de réponse à cette question en étudiant la réactivation de l'apoenzyme par différents métaux (chap. III). Cette solution ne nous a donné que des résultats négatifs, l'enzyme privé de son métal étant inactivé dans les conditions expérimentales choisies.

Nous avons dès lors cherché à nous rendre compte si effectivement l'activité GG correspondait bien à un enzyme distinct de l'amino-carboxypeptidase inhibée par Co. L'alanylglycine a été retenue comme substrat d'identification de ce deuxième enzyme.

Ce chapitre est consacré aux essais réalisés dans le but de séparer les deux enzymes après avoir fait le bilan des points qu'ils ont en commun ou au contraire par lesquels ils diffèrent.

I — Caractères communs aux activités AG et GG

— Les dipeptides hydrolysés par la fraction amino-carboxypeptidasique purifiée, le sont également par les extraits bruts, il n'y a donc pas eu au cours de la purification selon le schéma mis au point, fractionnement du matériel dipeptidasique en amino-carboxypeptidases spécifiques des dipeptides étudiés.

— Au cours de la précipitation par l'acétone et l'éthanol à différents pH et volumes de réactif, c'est pour les mêmes pH et les mêmes volumes que l'on récupère le maximum d'activité AG et GG dans les précipités (chap. I, p. 43).

C'est aussi entre les mêmes limites de concentration en sulfate d'ammonium que précipitent les activités AG et GG.

TABLEAU 42

Précipitation de l'amino-carboxypeptidase par le sulfate d'ammonium

Précipités	P. 100 d'activités récupérées dans les précipités	
	AG	GG
0-0,5 S	0	2
0,5-0,8 S	61	42
0,8-1,0 S	20	33

Un certain volume d'extrait enzymatique est amené par addition de sulfate d'ammonium cristallisé successivement à 50 p. 100 80 p. 100 et 100 p. 100 de saturation calculée à 0°C (0,5 S, 0,8 S, 1 S). Les précipités sont lavés une fois avec une solution de sulfate d'ammonium dissous dans un volume donné de *Tris* HCl pH 8,0, 0,01 mol et dialysés 16 heures contre le même tampon. Extraits enzymatiques : précipité acétonique de E_1 ou E_3. Les mêmes résultats sont obtenus à pH 7,0 et 8,0.

— Le rapport des activités AG/GG ne subit pas de variation significative le long du pic dipeptidasique lors de la chromatographie sur DEAE-cellulose des extraits E_3 (chap. II, fig. 15, p. 72).

— Bien que les activités GG paraissent plus thermostables que les activités AG, l'une et l'autre présentent le même pH de stabilité maximale (chap. III p. 78).

— L'une et l'autre ont un comportement analogue vis-à-vis des complexants métalliques et présentent les caractères de métalloenzyme (chap. III).

— L'hydrolyse des substrats mélangés AG + GG, contrairement à celle de AG + LGG (chap. I, tabl. 4, p. 42), correspond aux erreurs d'expériences près, à la moitié de l'hydrolyse des substrats séparés comme si le même enzyme était responsable de l'hydrolyse de ces deux substrats.

TABLEAU 43

Hydrolyse des substrats mélangés AG et GG

	Micromolécules de substrats hydrolysées (1)			Résultats théoriques calculés en admettant l'existence	
	AG	GG	AG + GG	de 1 enzyme	de 2 enzymes
Expérience I	7,0	9,0	8,5	8,0	16
Expérience II	14	18	15	16	32

(1) Activités AG, GG et AG + GG mesurées en présence de Co et PO_3^- 5×10^{-4} mol.

(Ces résultats sont cependant difficiles à interpréter car la vitesse d'hydrolyse de GG, très faible en l'absence de cobalt par rapport à celle de AG, nous a contraint à réaliser les essais en présence de ce métal, à une concentration où l'activité AG est partiellement inhibée).

En définitive tout cet ensemble de faits paraît bien indiquer que les activités AG et GG du matériel amino-carboxypeptidasique isolé sont le résultat de l'activité d'un même enzyme.

Cependant ces activités ont par ailleurs des points par lesquels elles diffèrent.

II — Différenciation des activités AG et GG

1. *Action des métaux*

L'action des métaux, du cobalt en particulier, fait apparaître, nous l'avons vu, une différence très significative entre les activités GG d'une part, AG, LG et GL d'autre part. Cependant l'hydrolyse d'autres peptides est activée aussi par Co, celle de la glycyl-l-sérine en particulier, et nous avons déjà discuté de l'insuffisance de ce test du point de vue identification des peptidases.

Mais le fait que l'amino-carboxypeptidase a les caractères d'un métalloenzyme donne un sens nouveau à l'activation de GG par le cobalt qui signifie alors que le complexe métal-enzyme est aisément dissociable (par le cobalt). Dans ce cas c'est la matrice protéique de l'enzyme qui est concernée.

Il y a là semble-t-il, un argument sérieux pour admettre comme vraisemblable l'hypothèse que deux enzymes sont responsables de l'hydrolyse de AG d'une part et GG d'autre part.

Par ailleurs, l'inhibition de GG par Hg, Pb, Ag, l'iode et le PCMB, plus faible que celle de AG, paraît indiquer une moindre réactivité de ses groupes thiols actifs. Dans ce cas également ce serait aussi la matrice protéique de l'enzyme qui serait concernée.

D'ailleurs d'autres différences significatives viennent étayer cette hypothèse ; parmi elles, citons la présence, dans les extraits des premiers stades de la purification, de forts inhibiteurs de GG sans effet sur l'activité AG et la plus grande affinité de l'activité AG pour les adsorbants et les gels de Sephadex.

2. *Présence d'inhibiteurs de GG dans les extraits enzymatiques*

Au cours de la purification, le rapport des activités AG/GG varie considérablement ; il passe de 10 à 20 dans les extraits bruts, à 2-3 après chromatographie sur DEAE-cellulose. C'est au cours de la dialyse que la variation est la plus importante, elle entraîne dans tous les cas une activation de GG et une inhibition de AG (lorsque l'hydrolyse de ce substrat est effectuée en l'absence de PO_3^-), mettant ainsi en évidence des inhibiteurs de GG et des activateurs de AG.

L'hydrolyse de GG par les extraits bruts décroît rapidement avec le temps, il n'en est plus de même dans les extraits dialysés.

La précipitation des extraits bruts par l'acétone et l'éthanol entraîne aussi des variations importantes du rapport AG/GG dans le même sens que la dialyse. Au cours de la précipitation des extraits bruts par 0,5 volume d'acétone à différents pH, AG/GG varie, dans l'exemple cité, de 8,3 dans E_1 à 3,1 — 1,8 — 2,6 — 3,0 dans les précipités correspondants respectivement aux pH 5,0 — 6,0 — 7,0 et 8,0

Avec l'éthanol comme agent précipitant, AG/GG est passé de 15 dans E_1 à 2,5 — 7 et 3,2 dans les précipités réalisés aux pH 5 — 6 et 7.

Ces variations sont dues pour une grande part à l'élimination d'un inhibiteur de GG puisque le rendement de récupération de cette activité, contrairement à celui de l'activité AG, est très supérieur à 100 dans les précipités aux pH 5,0 — 6,0 et 7,0 (tabl. 5, page 43). et que ces variations ne s'observent pratiquement plus si l'expérience est refaite à partir de dialysats.

La chromatographie sur DEAE-cellulose et hydroxylapatite, donne aussi des rendements de récupération de l'activité GG souvent supérieur à 100. Il existe donc dans les extraits bruts un ou plusieurs inhibiteurs de l'activité GG sans effet sur l'activité AG puisque la récupération de cette activité est quantitative.

3. « *Affinité* » *de l'activité AG pour les adsorbants*

Par différentes techniques (technique du « *batch* », mesure des isothermes d'adsorption, analyse frontale), certains adsorbants ont été sélectionnés qui ont la propriété de fixer le matériel dipeptidasique.

Il est ainsi possible d'épuiser complètement les extraits enzymatiques de leurs activités dipeptidasiques (chap. I p. 45) qui peuvent ensuite être déplacées de l'adsorbant par un éluant convenable (fig. n° 5, p. 47). Par ailleurs, les métaux ne provoquent aucune activation de l'activité AG éluée (tabl. 31, p. 81). Dans ces

expériences il ne s'agit donc pas de phénomènes de rétention par l'adsorbant d'un métal nécessaire à l'activité de l'enzyme (1).

L'activité AG présente vis-à-vis de ces adsorbants un comportement tout à fait différent de celui de l'activité GG. Il se traduit par des variations significatives des rapports des activités AG/GG :

— Les extraits dipeptidasiques traités, suivant la technique du « *batch* », voient leur rapport AG/GG passer de 2,5 dans le témoin à 1,7 — 1,5 — 1,4, — 1,3 dans les extraits partiellement épuisées.

Le négril et la terre à foulon paraissent particulièrement sélectifs puisque 200 mg de ces produits adsorbent environ 50 p. 100 des activités AG et 0 à 20 p. 100 des activités GG (tabl. 44).

TABLEAU 44

Adsorption des activités dipeptidasiques par divers adsorbants

	Activités résiduelles		AG / GG
	U AG	U GG	
Extrait enzymatique avant traitement.	41	16	2,55
Extrait traité par :			
Acide silicique (Mallenckrodt)	39	16	2,45
Gel de silice Levilite (Prolabo)	40	20	2,00
Alumine pour chromatogr. (Prolabo)..	39	17	2,30
Poudre de cellulose Whatman	40	18	2,2
Charbons adsorbants { Charcoal	43	18	2,4
Charbons adsorbants { Activit	33	19	1,7
Charbons adsorbants { Negril.....	20	13	1,5
Terre à foulon (Prolabo)	22	17	1,3
Hydroxylapatite (1) 200 mg	0	0	
Hydroxylapatite (2) 100 mg	7,5	5,3	1,4

(1) Dans un tube à centrifuger, on introduit 200 mg d'adsorbant et 10 ml d'extrait enzymatique à pH 8,0 *Tris* HCl 0,001 mol. Après 20 minutes d'agitation, l'extrait traité est analysé après centrifugation.

(2) Préparé selon la technique de Tiselius (1956).

— Les gels de Sephadex ont la propriété d'adsorber, en l'absence de sels, certaines protéines (Glazer et Wellner, 1962). Cette propriété se vérifie aussi pour les activités dipeptidasiques de la levure, comme le montre la comparaison des coefficients de partage des activités AG et GG mesurées en présence de sels dans les gels G 75 — G 100 — G 200 et leur liquide d'inbibition (voir tabl. 47 p. 105) :

(1) Mais l'intervention de causes autres que l'adsorption des enzymes, n'est pas non plus exclue, en particulier l'élimination d'un inhibiteur de l'activité GG, comme le montre son rendement de récupération parfois supérieur à 100, après chromatographie d'adsorption. Élimination qui peut se traduire par un déficit d'adsorption de cette activité. Il ne peut donc être question ici que d'adsorption ou d'affinité apparentes.

En l'absence de sels, les coefficients de partage des activités AG dans G 75 et G 200, égaux ou supérieurs à 1 et très différents de ceux des activités GG, sont significatifs d'une adsorption sur ces gels et d'une plus grande affinité pour eux de l'activité AG. Dans les conditions des expériences ayant servi à mesurer ces coefficients de partage, le rapport des activités AG/GG de l'extrait dipeptidasique est passé de 2,7 à 1,3 après traitement au G 200.

Ainsi, dans les extraits traités par ces différents adsorbants, on observe des variations significatives du rapport des activités AG/GG comme si l'activité AG présentait une affinité plus grande que l'activité GG pour les adsorbants.

Inversement l'élution des activités AG fixées est plus difficile que celle des activités GG, leur récupération n'est jamais quantitative et on observe dans les éluats des variations significatives du rapport des activités AG/GG :

— *Avec le Négril,* elle est pratiquemment nulle en ce qui concerne les activités AG et très faible en ce qui concerne les activités GG quelle que soit la force de l'éluant.

— *Avec l'hydroxylapatite,* suivant la technique du « *batch* », le rendement de récupération de l'activité GG est plus élevé que celui de l'activité AG ; les différences sont plus grandes à 0,125 mol qu'à 0,25 mol ; à pH 8,0 et sur l'hydroxylapatite II, le rapport AG/GG passe de 2,9 dans l'extrait primitif à 0,6 dans l'éluat réalisé par le tampon phosphate 0,125 mol pH 8,0.

TABLEAU 45

Élution de l'amino-carboxypeptidase adsorbée sur l'hydroxylapatite par la technique du batch

Éluant tampon phosphate	Activités récupérées		$\frac{AG}{GG}$
	AG (%)	GG (%)	
I — *de l'enzyme adsorbé sur hydroxylapatite I* (1)			2,9 dans l'extrait initial
pH 7,0 (0,05 mol	0	traces	
pH 7,0 (0,125 mol	34	75	1,2
pH 7,0 (0,250 mol	96	166	1,5
II — *de l'enzyme adsorbé sur hydroxylapatite II* (1)			
pH 8,0 (0,05 mol	0	traces	
pH 8,0 (0,125 mol	15	66	0,6
pH 8,0 (0,250 mol	50	100	1,2

(1) Hydroxylapatite I et II préparées respectivement à pH 7,0 et à 8,0. Dans les tubes à centrifuger on introduit 10 ml d'extrait enzymatique et 500 mg d'hydroxylapatite. Après 20 minutes d'agitation les extraits traités, centrifugés, sans activités dipeptidasiques, sont rejetés et les culots élués par deux fois 5 ml de tampon phosphate au pH et à la molarité choisie.

Nous retrouvons les mêmes variations AG/GG en chromatographie sur colonne en éluant les activités dipeptidasiques fixées sur l'adsorbant par des tampons phosphates de différentes concentrations :

TABLEAU 46

Chromatographie des amino-carboxypeptidases sur hydroxylapatite II

Expérience I				Expérience II			
Fraction	Pourcentage d'activités récupérées		AG/GG	Fraction	Pourcentage d'activités récupérées		AG/GG
	AG	GG			AG	GG	
0,05 mol	10	35	0,68	0,05 mol	7	25	0,73
0,075 mol	44	65	1,3	0,10 mol	66	85	1,7

8 ml d'extrait enzymatique sont introduits dans une colonne (20 × 0,9 cm) réfrigérée contenant 500 mg d'hydroxylapatite II. La colonne est rincée par 8 ml de tampon phosphate 8,0 0,001 mol puis les activités éluées successivement par 10 ml tampon phosphate pH 8,0 0,05 mol et 0,075 mol (expérience I) et 10 ml, 0,05 mol et 0,10 mol (expérience II).

Le même comportement est observé : (*a*) *sur terre à foulon* mais l'élution est à la fois plus difficile et plus sélective : AG/GG varie de 0,2 à 0,8 suivant la force croissante de l'éluant ; le tampon phosphate 0,25 mol n'élue que 25 p. 100 de AG et 72 p. 100 de GG. (*b*) *sur DEAE-cellulose* où le pourcentage d'activité récupérée est toujours plus élevé pour GG que pour AG et plus faible sur grande colonne que sur petite colonne quelle que soit la molarité du tampon *Tris* HCl d'élution comme si un mécanisme d'adsorption interférait sur le mécanisme d'échange d'ions.

Ainsi, dans tous les cas, on élue davantage d'activité GG que d'activité AG et le rapport de ces activités AG/GG croît avec la molarité de l'éluant.

Mais l'expérience qui suit est la plus significative d'une « affinité » particulière de l'activité AG pour les adsorbants.

« *Adsorption* » *sur le support électrophorétique.* — Une des imperfections bien connue de l'électrophorèse de zone sur papier est l'adsorption possible des protéines migrantes sur le support électrophérétique, adsorption d'autant plus importante que le chemin parcouru est plus long.

Nous avons donc cherché à nous rendre compte de l'adsorption des activités AG et GG au cours d'électrophorèses de durées variables et à vérifier par ce moyen les résultats des expériences précédentes.

Techniques expérimentales.

Après différents essais d'orientation réalisés dans le but de préciser l'influence de la nature du tampon, du pH, de la force ionique et de la tension appliquée, les conditions expérimentales retenues ont été les suivantes :

Support : Papier Arches 304 découpé en bandes de 5 × 27 cm, tampon phosphate pH 8,0, force ionique 0,05, 220 volts, 0,3 à 0,3 mA/cm, température + 3°C.

Matériel enzymatique : Précipité acétonique de l'enzyme débarrassé de ses impuretés nucléiques. Dépôt de 35 à 50 µl d'une solution à 2,1 p. 100 de protéine dans le tampon d'électrophorèse.

Le point O est mesuré en tenant compte du flot électro-osmotique apprécié par la mobilité du glucose dont une goutte est déposée sur le bord de la bande et révélé après électrophorèse par la soude 4 p. 100 et chauffage à l'étuve à 100°.

Élution des enzymes : après l'électrophorèse, la bande de papier séchée dans un courant d'air froid est découpée en languettes de 0,5 cm de large de part et d'autre du point O. Chaque languette est placée dans un tube à hémolyse et immergée dans 2 ml de tampon *Tris* 0,01 mol pH 8,0. Après environ 15 minutes et plusieurs agitations, elles sont appliquées le long de la paroi du tube et lavées avec soin par 3 ml de tampon et essorées.

Le volume de chaque fraction est ainsi suffisant pour y mesurer les activités AG et GG, conditions indispensables pour rendre les conditions expérimentales rigoureusement identiques pour les deux activités.

Les diagrammes correspondant à des électrophorèses de durée croissante rendent parfaitement compte de l'adsorption progressive de l'activité AG au cours de sa migration sur le papier.

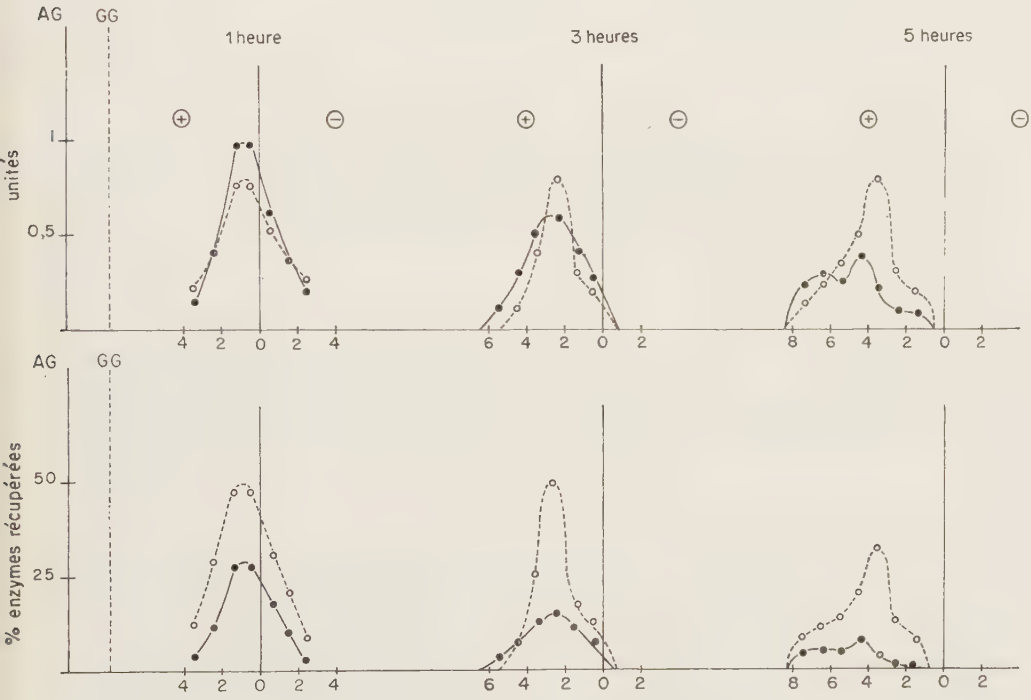


FIG. 21. — *Influence de la durée de l'électrophorèse sur l'adsorption des activités AG et GG poursuivie pendant 1-3 et 5 heures.*

Les résultats sont exprimés, d'une part en activités AG et GG récupérées le long du support électrophorétique et d'autre part en p. 100 de ces activités.

La courbe d'élution de AG qui était nettement au-dessus de celle de l'activité GG après 1 heure d'électrophorèse, passe ensuite nettement en dessous, le rapport des activités AG/GG s'inverse : il passe de 2,2 dans l'extrait primitif à 1,25 — 0,75 et 0,25 dans le pic dipeptidasique après 1 heure — 3 heures et 5 heures d'électrophorèse.

Après 5 heures on ne récupère plus que 30 p. 100 de AG contre encore 100 p. 100 de GG. Ce phénomène d'adsorption sur le support électrophorétique est indépendant du pH et de la nature du tampon.

Remarques :

1. Les activités AG et GG présentent une mobilité anodique jusqu'au dernier pH testé 5,5. L'amino-carboxypeptidase est donc jusqu'à ce pH une protéine anionique.

2. Autant qu'on en puisse juger, étant donné les phénomènes d'adsorption observés, les mobilités de ces activités paraissent voisines sinon identiques.

3. L'activité spécifique de GG, multipliée par 5 environ dans la fraction du pic dipeptidasique, par rapport à celle de l'extrait primitif, laisse supposer que l'électrophorèse de zone sur un support se rapprochant davantage des conditions de l'électrophorèse libre, serait une bonne technique de purification de l'amino-carboxypeptidase et peut être aussi de séparation de l'aminopeptidase qui précipite à un pH où l'amino-carboxypeptidase reste en solution (tabl. 6, p. 44).

4. *Inclusion de l'activité AG dans les gels de Sephadex*

L'inclusion des activités AG et GG dans les gels de Sephadex G 75, G 100 et G 200, a été étudiée par la technique du « *batch* » et chiffrée par la mesure des coefficients de partage des activités entre la phase fixe (les gels) et leurs liquides d'imbibition. Elle a été mesurée comparativement en présence et en absence de sels dans le but d'apprécier les possibilités d'adsorption des activités sur Sephadex (voir plus haut page 102).

Les tests d'inclusion des activités dipeptidasiques ont été réalisés comparativement à celui de l'activité LGG. Vu les différentes informations déjà acquises sur les propriétés de l'aminopeptidase (notamment sur sa solubilité et son affinité moindres pour les adsorbants), il nous a paru intéressant en effet de comparer aussi son encombrement moléculaire à celui du matériel amino-carboxypeptidasique.

Techniques expérimentales.

500 mg de Sephadex G 75 — G 100 et G 200 sont mis à gonfler trois jours dans de l'eau désionisée d'une part, dans du tampon phosphate 0,33 mol pH 7,5 d'autre part. Les gels sont ensuite filtrés sous succion d'une trompe à vide pour éliminer les liquides interstitiels puis équilibrés chacun d'eux avec 3 ml d'extrait enzymatique débarrassé des impuretés nucléiques, de même force ionique que le tampon de gonflement des gels, sous agitation mécanique pendant 20 minutes. Les extraits sont ensuite séparés des gels par filtration sous succion, leurs volumes notés, puis analysés. A partir des résultats obtenus et des teneurs en enzymes des extraits initiaux, les quantités de peptidase retenue par les gels et restées en solution ont été calculées, le rapport de ces quantités donne les coefficients de partage K LGG, K AG et K GG.

Les résultats rassemblés dans le tableau ci-dessous correspondent à la moyenne de plusieurs expériences, nous ne discuterons pas ceux concernant l'inclusion en l'absence de sel qui l'ont déjà été par ailleurs (p. 102).

— L'inclusion des activités AG et GG pratiquement nulle dans G 75, est faible dans G 100 et appréciable dans G 200.

— L'inclusion de l'activité AG est plus importante que celle de l'activité GG, mais les différences observées dans ces coefficients de partage laissent peu de chance pour la séparation préparative des deux activités compte tenu de l'étalement des zones au cours de l'élution.

TABLEAU 47

Inclusion des activités peptidasiques dans Sephadex

Gels de Sephadex	Coefficients de partage mesurés par la technique du « *batch* »				
	en l'absence de sel		en présence de sel		
	K AG	K GG	K LGG	K AG	K GG
G 75	1,0	0,4	0	0,05	0,06
G 100	0,7	0,11	0	0,21	0,11
G 200	2,9	1,1	0	0,52	0,25

— Au contraire l'aminopeptidase se distingue nettement de l'amino-carboxypeptidase par une inclusion nulle dans les 3 gels. On peut donc prévoir comme possible la séparation de ces deux enzymes par chromatographie d'inclusion sur Sephadex. Le gel G 200, dans lequel l'inclusion des activités dipeptidasiques est maximale et celle de l'aminopeptidase encore nulle, est le support devant permettre la meilleure séparation.

En résumé, les résultats de ce paragraphe II font apparaître des différences nettes dans le comportement des activités AG et GG vis-à-vis (*a*) des métaux, (*b*) d'effecteurs contenus dans les extraits enzymatiques, (*c*) des adsorbants, (*d*) des tamis moléculaires. Il semble donc que, en dépit de leurs points communs (§ I), ces activités sont bien le fait de deux enzymes distinctes. Nous avons dès lors tenté de les séparer.

III — Essais de séparation des emzynes hydrolysant l'alanylglycine et la glycylglycine.

La précipitation par les solvants organiques ou le sulfate d'ammonium ne permet pas d'isoler l'enzyme hydrolysant GG de celle hydrolysant AG, aussi avons-nous utilisé des techniques faisant appel à d'autres propriétés que la solubilité telle que l'échange d'ions, l'adsorption ou le tamisage moléculaire.

1. *Chromatographie d'échange d'ions sur DEAE-cellulose*

Nous avons vu que la chromatographie sur DEAE-cellulose, appliquée au matériel dipeptidasique, simplement débarrassé des acides nucléiques, n'entraînait pas de variations significatives du rapport des activités AG et GG le long du pic dipeptidasique que l'élution ait été réalisée avec ou sans gradient.

Ces expériences ont été reprises sur un matériel débarrassé de l'essentiel de ses impuretés nucléique, protéique et polysaccharique par une première chromatographie sur DEAE-cellulose.

Dans ces conditions la charge des colonnes en N protéique est dix fois plus faible d'un matériel dipeptidasique purifié 20 à 30 fois par rapport au précédent.

L'élution a été réalisée selon différents gradients sur des colonnes contenant soit 5, soit 15 ml d'échangeurs.

L'examen du diagramme d'élution correspondant à ces expériences montre que ces deux activités sortent en même temps de la colonne mais dans tous les cas le pic AG asique précède le pic GG asique d'une fraction et le rapport AG/GG varie. Dans l'expérience citée, ce rapport est de 3 dans le pic AG asique et de 2,0 dans le pic GG asique.

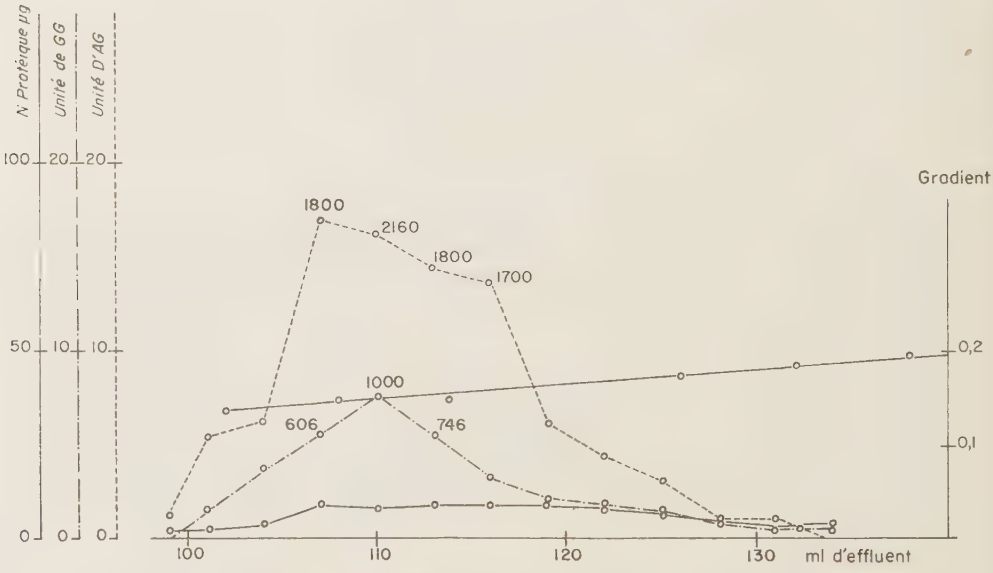


FIG. 22. — *Chromatographie de l'amino-carboxypeptidase purifiée sur DEAE-cellulose*

Colonne (40 × 1,2 cm) réfrigérée renfermant 15 ml DEAE-cellulose, charge de la colonne : 0,4 mg N protéique 140 U AG, 40 U GG. Élution suivant gradient réalisé par introduction de tampon *Tris* HCl pH 8,0 0,5 mol dans 200 ml *Tris* HCl 0,01 mol. Les 97 premiers ml d'effluent sont rejetés puis le reste recueilli par fraction de 3 ml, vitesse d'élution 0,35 ml/minute sous une pression hydrostatique de 60 cm.

Cependant la DEAE-cellulose ne permet pas de mettre en évidence les deux amino-carboxypeptidases dans le matériel isolé. Il convient au contraire de remarquer les faibles variations des activités spécifiques de AG dans les 4 fractions les plus riches comme si ce matériel dipeptidasique était homogène. L'enzyme hydrolysant AG, hydrolyserait donc également GG.

Remarquons aussi l'excellente purification réalisée par cette chromatographie sur DEAE-cellulose : 45 fois pour AG et 400 fois pour GG dans la fraction des pics, par rapport aux activités spécifiques de l'extrait brut E_1 (C AG 40), C GG 2,5) malgré une perte d'activité de 40 p. 100 lors de la dialyse de l'extrait enzymatique avant son introduction sur la colonne.

2. *Chromatographie d'adsorption sur hydroxylapatite*

Ces expériences ont été conduites également sur un matériel dipeptidasique purifié 20 à 30 fois par chromatographie sur DEAE-cellulose puis dialysé pour éliminer le tampon d'élution. Le diagramme de la figure 23 rend compte de l'une de ces expériences.

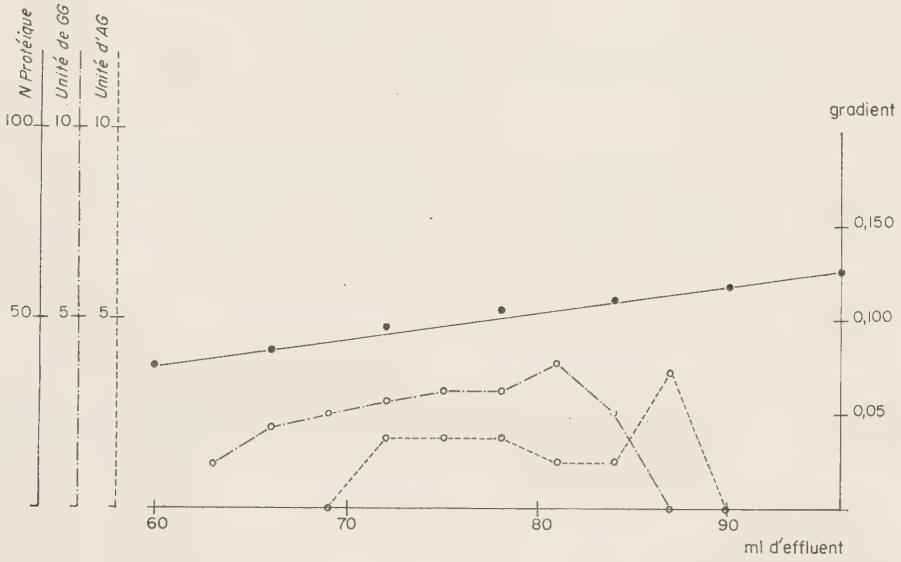


FIG. 23. — *Chromatographie de l'amino-carboxypeptidase purifiée sur hydroxylapatite.*

Colonne (20 × 0,9 cm) réfrigérée renfermant 500 mg d'hydroxylapatite. Charge de la colonne : 0,33 mg N protéique, 170 U AG, 29 U GG. Élution suivant gradient réalisé par introduction de tampon phosphate pH 8,0 0,25 mol dans 100 ml tampon 0,001 mol. Les 39 premiers ml d'effluent sont rejetés puis la fraction dipeptidasique recueillie par fraction de 2 ml. Vitesse d'élution 0,25 ml/minute, sous une pression hydrostatique de 60 cm.

GG commence à sortir de la colonne 3 fractions avant AG et finit de passer 1 fraction avant si bien que dans cette séparation, trois fractions exemptes d'AG et une fraction exempte de GG ont été obtenues.

Le rapport des activités AG/GG est inversé par rapport à l'expérience précédente de chromatographie sur DEAE-cellulose. GG est plus facilement éluée que AG. Ces résultats confirment ceux précédemment obtenus relatifs à l'adsorption et la désorption des activités AG et GG sur différents adsorbants et sur le papier au cours de l'électrophorèse.

Il y a bien là, semble-t-il, une preuve de la pluralité des systèmes enzymatiques responsables de l'hydrolyse de ces activités.

3. *Chromatographie d'inclusion sur Sephadex*

La technique du « *batch* » nous a donné des indications précieuses sur les possibilités des Sephadex du point de vue fractionnement du matériel peptidasique.

Ces expériences ont donc été conduites avec le double objectif de vérifier ces possibilités de séparation (*a*) des matériels aminopeptidasique et amino-carboxypeptidasique et (*b*) des activités AG et GG.

Dans ce but, deux matériels enzymatiques ont été utilisés : l'un contenant l'aminopeptidase et l'amino-carboxypeptidase *d* 280/260 mμ = 0,9, l'autre contenant l'amino-carboxypeptidase débarrassée de l'aminopeptidase, de 75 p. 100 des protéines inactives, 95 p. 100 des polysaccharides et des acides nucléiques, (*d* 280/260 mμ = 1,5).

Les gels G 100 et G 200 ont été testés et ce dernier sur des colonnes renfermant 30 ml d'une part et 100 ml d'autre part de gel.

Techniques expérimentales.

Les coefficients de partage sont calculés à partir du volume d'élution V_e, du volume mort V_o et du volume interne V_i de la matrice du gel suivant la formule $K = \frac{V_e - V_o}{V_i}$. V_i est une caractéristique de la colonne calculée à partir du poids sec de Sephadex mis sur la colonne et de son *water regain* W_r : $V_i = a \times W_r$.

Caractéristiques des colonnes

	Lit de gel dans la colonne		Poids de Sephadex sec (*a*) (g)	*Water regain Wr*	Volume interne V_i du gel (ml)	Volume mort (1) (ml)
	Volume (ml)	Hauteur (cm)				
Colonne G 100	30	26	1,8	10	18	11
Colonne G 200 1 ...	30	26	0,8	20	16	12
Colonne G 200 2 ...	100	41	3,6	20	72	30

(1) mesuré avec une solution d'encre de Chine, ou de bleu dextrane 2000 0,2 p. 100 dans le tampon d'élution. Le compactage des colonnes est réalisé en introduisant dans la colonne inclinée à 45° le gel sous la forme d'une pâte semi-fluide en évitant d'emprisonner des bulles d'air.

Les résultats de ces expériences confirment ceux obtenus par la technique du « *batch* » :

— Sur G 100 l'essentiel des protéines et l'activité LGG passent après 12 ml d'effluent c'est-à-dire avec le volume mort de la colonne (K LGG = 0) et les activités AG et GG ensemble après 14 ml ce qui traduit un début d'inclusion de l'amino-carboxypeptidase (K AG et K GG = 0,17).

— Sur G 200 (volume de gel 30 ml) s'amorce un fractionnement des protéines à la suite d'un pic exclu du gel. L'aminopeptidase sort de la colonne sitôt après ce pic (K LGG 0,06), vient ensuite l'amino-carboxypeptidase (K AG = K GG 0,40) (fig. 24).

Les pics de ces deux enzymes sont séparés par 5,5 ml, volume qui n'est pas tellement loin de celui calculé à partir des résultats obtenus par la technique du « *batch* » mais aucune amorce de séparation des activités AG et GG n'est observée.

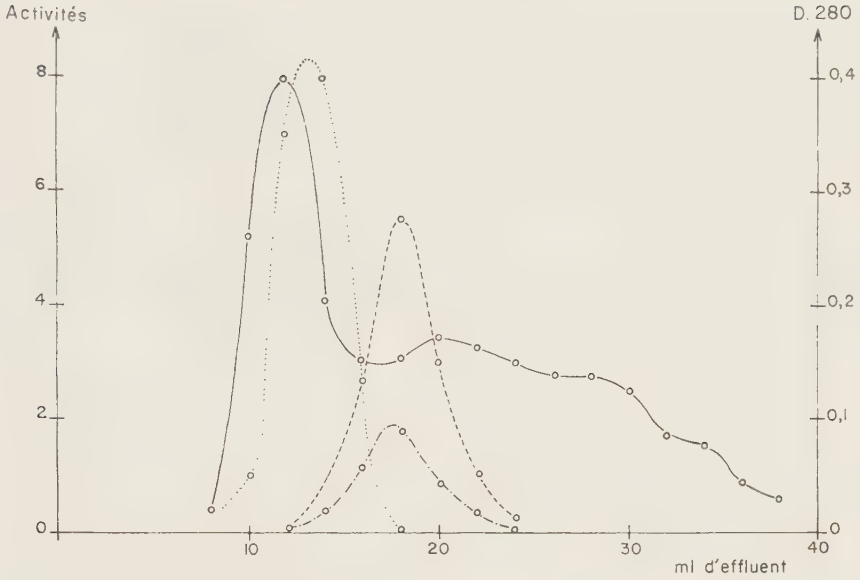


FIG. 24. — *Chromatographie d'inclusion des peptidases sur Sephadex G 200*

Colonne (1,2 × 40 cm) réfrigérée renfermant 30 ml gel Sephadex G 200. Charge de la colonne 1 ml extrait enzymatique 21 U LGG, 12 U AG et 5 U GG. Élution par tampon phosphate 0,033 mol, pH 7,5. Débit 0,05 ml/minute sous une pression hydrostatique de 60 cm.

Activités AG — —, GG •—•—•—, LGG ·····Protéines———.

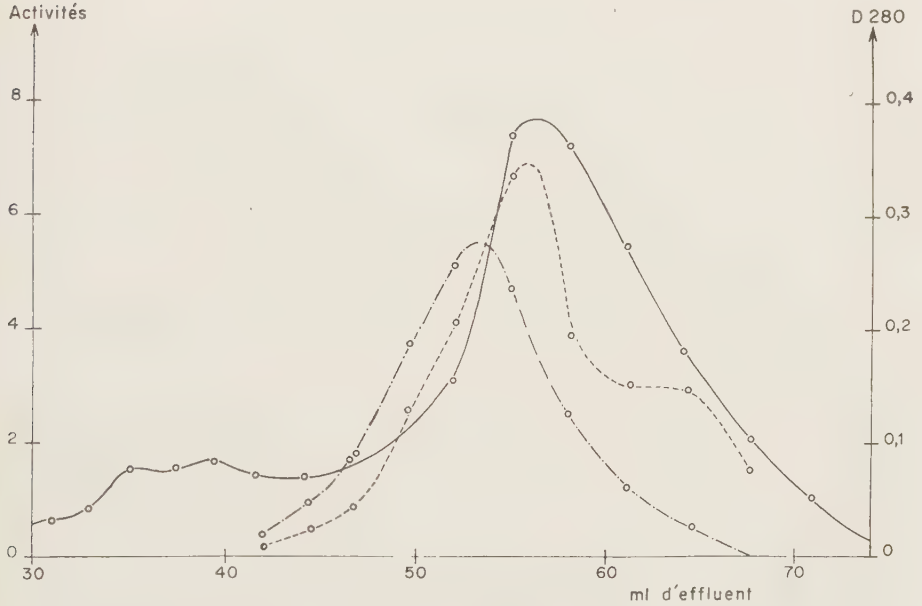


FIG. 25. — *Chromatographie d'inclusion de l'amino-carboxypeptidase sur Sephadex G 200*

Colonne (1,8 × 65 cm) réfrigérée renfermant 100 ml de Sephadex G 200. Charge de la colonne 0,5 ml extrait enzymatique contenant 27 U AG, 20 U GG. Élution par tampon phosphate 0,033 Mol pH 7,5, débit 0,035 ml/minute sous une pression hydrostatique de 60 cm.

Activités AG— — — —, GG —•—•— Protéines———.

Cependant celle-ci est partiellement réalisée par percolation sur un plus grand volume (100 ml)de gel de Sephadex G 200 du matériel dipeptidasique purifié.

Dans l'expérience décrite (fig. 25), le pic des activités GG sort de la colonne 2,5 ml avant le pic des activités AG, indiquant une inclusion plus faible des premières ; les coefficients de partage mesurés sont de 0,32 pour GG et 0,35 pour AG.

Ces expériences permettent d'autres conclusions :

1. Il est intéressant de remarquer que (*a*) le pic protéique sortant sitôt après le volume mort, dans l'expérience réalisée avec le matériel peptidasique non purifié (fig. 24), est réduit à un plateau de peu d'importance après purification (fig. 25). (*b*) le rapport *d* 280/260 mμ passe dans la fraction dipeptidasique de 1,5 à 1,8 ce qui indique un fractionnement des protéines et des acides nucléiques sur Sephadex G 200. (*c*) lors du tamisage moléculaire des extraits enzymatiques non purifiés sur G 200 (expérience de la fig. 24), les polysaccharides passent sitôt après le volume mort en même temps que le pic protéique. Ces résultats montrent donc l'intérêt de la chromatographie d'inclusion sur Sephadex G 200 pour la purification de l'amino-carboxypeptidase du point de vue des protéines, de l'aminopeptidase, des impuretés nucléiques et des polysaccharides.

2. L'inclusion nulle de l'activité LGG dans G 200 et l'inclusion faible mais non négligeable des activités AG et GG dans G 200 permettent de situer très approximativement les poids moléculaires de l'aminopeptidase au-dessus de 200 000 et de l'amino-carboxypeptidase aux environs de 100 000.

Résumé du chapitre IV

Les activités AG et GG ont un comportement voisin sinon identique vis à vis de la DEAE-cellulose. Elles ont aussi le même pH optimal de stabilité et ne sont pas séparées par la technique de purification mise au point. En mélange, les substrats AG et GG sont hydrolysés apparemment par le même enzyme.

En dépit de tous ces points qu'elles ont en commun, les activités AG et GG ont par ailleurs un comportement suffisamment différent pour suggérer que deux enzymes sont responsables de ces activités.

Les points par lesquels elles diffèrent, sont leur comportement respectif vis-à-vis des métaux, d'effecteurs présents dans les extraits enzymatiques, des adsorbants et des gels de Sephadex.

L'enzyme hydrolysant GG et activable par Co « glycylglycine dipeptidase » correspondrait donc bien à un enzyme distinct de l'enzyme hydrolysant AG. Sa moins grande affinité pour les adsorbants les plus variés et son inclusion légèrement plus faible dans le Sephadex G 200 qui concerne sa matrice protéique, sont significatives à cet égard.

Ces propriétés ont d'ailleurs été mises à profit pour amorcer sa séparation par chromatographie sur hydroxylapatite et sur Sephadex G 200, mais elle n'a pas été isolée de façon préparative.

Les autres techniques faisant appel à la chromatographie d'échange d'ions ou la précipitation fractionnée par les solvants organiques ou le sulfate d'ammonium se sont révélées inefficaces.

Les protéines des enzymes hydrolysant la glycylglycine d'une part et l'alanylglycine d'autre part, ont donc des propriétés très voisines aussi bien du point de vue charge électrique (elles sont anioniques jusqu'au dernier pH testé 5,5) qu'encombrement moléculaire et solubilité.

L'aminopeptidase est, au contraire, nous l'avons vu par ailleurs, très facilement isolée. Dans ce chapitre son exclusion des gels de Sephadex fait apparaître qu'elle a en outre un poids moléculaire très différent de celui du matériel amino-carboxypeptidasique.

Ces résultats n'excluent pas la possibilité de la présence dans le matériel isolé de la levure étudiée d'autres amino-carboxypeptidases capables d'hydrolyser d'autres dipeptides qui n'ont pas été testés.

CHAPITRE V

LE MATÉRIEL AMINOPEPTIDASIQUE DE *SACCHAROMYCES CEREVISIAE ELLIPSOIDEUS*

Étant donné l'importance du point de vue quantitatif des activités LGG et AG-amide de la levure étudiée, il nous a paru intéressant de rappeler dans un chapitre, les données acquises indirectement sur le ou les enzymes(s) responsable(s) de ces activités, au cours de notre étude sur l'amino-carboxypeptidase.

— La présence dans la levure étudiée d'un matériel aminopeptidasique a été précisée par l'hydrolyse de substrats C substitués — alanylglycineamide, glycylglycineamide — et par la mise en évidence, par chromatographie, de l'attaque de la leucylglycylglycine du côté de la leucine (chapitre I).

— Il diffère de l'amino-carboxypeptidase par (*a*) sa moindre solubilité dans les solvants organiques — éthanol, acétone — (chap. I), (*b*) son pH de précipitation et sa thermorésistance (chap. I), (*c*) sa moindre affinité pour les adsorbants (chap. I et IV), (*d*) son encombrement moléculaire plus élevé (chapitre IV).

L'une ou l'autre de ces propriétés pourrait être ou a été mise à profit pour l'isoler : il est facilement séparé de l'amino-carboxypeptidase par chromatographie d'adsorption sur hydroxylapatite (chap. I fig. 5) ou d'inclusion sur Sephadex G 200 (chap. IV fig. 24).

— Ce matériel aminopeptidasique a été purifié 25 fois vis-à-vis de LGG par dialyse des extraits bruts, suivie d'une percolation sur Dowex 1 × 8 et d'une précipitation par 0,5 volume d'acétone à pH 8,0 qui permettent d'éliminer l'essentiel des impuretés nucléiques et polysacchariques et une bonne partie de l'amino-carboxypeptidase (chap. II).

— Son pH optimal est voisin de 7,0 pour LGG et la GG-amide et compris entre 7 et 8 pour l'AG amide.

— Sa spécificité vis-à-vis d'autres peptides n'a pas été étudiée mais il hydrolyse LG 5 fois moins rapidement environ que LGG. Il n'hydrolyse pas AG, GL et GG tout au moins dans les limites de temps utilisées pour l'hydrolyse de LG. Ces dipeptides, s'ils sont hydrolysés, le sont donc beaucoup plus lentement que LG (chap. I).

— Il est inhibé par tous les métaux testés mais son inhibition par les complexants métalliques EDTA, OP, dont le caractère non compétitif a été vérifié, indique qu'un métal est nécessaire à son activité (chap. I).

D'autre part, l'allure de sa courbe d'inhibition, en fonction de la concentration en complexant, est différente de celle de l'amino-carboxypeptidase (chap. I).

Ce matériel amino-peptidasique par son inhibition par les complexants et son activité LG, présente des points communs avec les leucine-aminopeptidases animales et l'aminopeptidase identifiée dans la levure par JOHNSON mais diffère de l'amino-peptidase de GRASSMANN et de la tripeptidase animale.

La mise en évidence de son activité LG est particulièrement intéressante car elle nous a permis d'écarter ce dipeptide des substrats d'étude de l'amino-carboxypeptidase.

Remarques.

D'autres enzymes ont été encore identifiés, beaucoup moins importants quantitativement tout au moins dans les conditions choisies d'extraction du matériel amino-carboxypeptidasique :

— *Un matériel carboxypeptidasique* hydrolysant CBZ AG, CBZ GG, la chloracétyl GG, de pH optimal voisin de 6,0, plus thermostable que l'amino-carboxypeptidase, présentant moins d'affinité qu'elle pour les adsorbants. Il est inhibé par EDTA (chap. I).

— *Un matériel endopeptidasique* hydrolysant CBZ AG amide, CBZ GG amide, à un pH optimal voisin de 6,0 ; sans doute aussi responsable de l'hydrolyse des protéines des autolysats et de l'hémoglobine de bœuf. (chap. I et II).

La spécificité endopeptidasique des « protéinases » de la levure n'avait pas encore été précisée mais il n'est pas exclu bien entendu, que les protéines soient hydrolysées aussi par d'autres enzymes que ce matériel endopeptidasique.

CONCLUSIONS

Dans notre avant-propos, nous avons défini les dipeptidases afin de les situer par rapport aux autres peptidases pouvant coexister avec elles dans le matériel biologique étudié : le terme de dipeptidase adopté depuis GRASSMANN pour désigner les enzymes hydrolysant seulement les dipeptides est tout à fait ambigu car d'autres enzymes sont capables d'hydrolyser les dipeptides ; aussi, lui avons nous substitué celui d'*amino-carboxypeptidase* directement relié à leur exigence de spécificité pour un groupe α-NH_2 et α-COOH libres dans leurs substrats.

En outre, cette nouvelle terminologie s'insère mieux dans celle utilisée pour les autres exopeptidases, les amino- et les carboxypeptidases.

Nous avons montré dans notre introduction le peu de connaissance que nous avons sur les amino-carboxypeptidases en raison essentiellement des difficultés que représente leur purification du fait de leur instabilité, du manque de substrats spécifiques et de leur dilution dans des milieux peptidasiques complexes. De plus l'existence de la plupart d'entre elles a été avancée sur la base de leur activation différentielle par les métaux dont nous avons discuté le peu de signification. A cet égard l'exemple le plus caractéristique est celui de la « glycyl-glycine dipeptidase » dont la spécificité a été admise sur essentiellement le critère de son activation par Co sans qu'aucune tentative n'ait été réalisée pour l'isoler des autres amino-carboxypeptidases.

Cependant leur inhibition assez générale par les complexants et l'activation différentielle de la plupart d'entre elles par les métaux sont du plus grand intérêt si nous relions ces propriétés à nos connaissances sur la carboxypeptidase dont il a été montré il y a peu de temps que la spécificité paraît pour une part liée à la nature du métal fixé à l'apoenzyme.

Les amino-carboxypeptidases seraient sans doute un matériel intéressant pour poursuivre ces recherches de spécificité liée au cofacteur métallique à condition que leur nature métalloprotéique soit précisée et qu'il soit possible d'obtenir leur apo-enzyme sous une forme réactivable.

Nous avons donc orienté notre travail vers les buts suivants :

— Identification du matériel dipeptidasique de la levure à spécificité amino-carboxypeptidasique.

— Recherche de la purification de la fraction amino-carboxypeptidasique.

— Étude de la fraction amino-carboxypeptidasique, orientée vers l'action des métaux et des complexants.

— Recherche de la pluralité éventuelle du matériel isolé.

Résultats obtenus

I — *Activités peptidasiques de la levure, identification de la fraction amino-carboxypeptidasique.*

Saccharomyces cerevisiae var. *ellipsoïdeus* constitue un matériel d'étude particulièrement intéressant en raison de sa richesse en activités peptidasiques et de la variété des systèmes enzymatiques qui en sont responsables : des activités endopeptidasiques et exopeptidasiques ont été décelées et parmi celles-ci des activités carboxypeptidasiques, aminopeptidasiques, et amino-carboxypeptidasiques ; ces deux dernières étant les plus abondantes dans les conditions expérimentales d'extraction choisies.

Les activités amino et amino-carboxypeptidasiques présentent de nombreuses propriétés différentes du point de vue : solubilité dans les solvants organiques (acétone, éthanol), pH de précipitation, affinité pour les adsorbants, comportement chromatographique sur DEAE-cellulose, hydroxylapatite ou Sephadex G 200, stabilité, action des complexants, pH optimal.

La mise en évidence de ces propriétés a permis (*a*) d'identifier avec certitude un matériel aminopeptidasique hydrolysant aussi LG et une ou plusieurs amino-carboxypeptidases, (*b*) de choisir des substrats convenables pour l'étude du matériel amino-carboxypeptidasique, l'alanylglycine et la glycylglycine. La leucylglycine a été écartée car hydrolysée également par l'aminopeptidase (certains travaux sur les amino-carboxypeptidases sont entachés d'erreur ou d'incertitude en raison du choix de ce dipeptide comme substrat spécifique), (*c*) d'orienter nos recherches pour la séparation de ces deux groupes d'enzymes.

— La présence d'un activateur de l'amino-carboxypeptidase dans les extraits bruts a été mise en évidence et sa nature et son mode d'action précisés : il s'agit de phosphates condensés (méta ou polyphosphates) complexants d'inhibiteurs métalliques.

II — *Extraction, isolement d'une fraction concentrée en activités dipeptidasiques*

La technique mise au point comporte après une autolyse sous toluène de courte durée de la levure, une dialyse de l'extrait brut ou mieux une précipitation fractionnée à l'acétone (l'amino-carboxypeptidase précipite entre 0,5 et 1 volume d'acétone) et plusieurs chromatographies successives sur échangeurs anioniques, d'abord Dowex 1 × 8 puis DEAE-cellulose, ou encore à ce dernier stade sur hydroxylapatite.

Cette technique permet d'éliminer l'aminopeptidase et l'essentiel des impuretés nucléique, polysaccharique et protéique. 99 p. 100 de protéines sont éliminées au dernier stade avec un bon rendement de récupération du matériel dipeptidasique purifié environ 50 et 200 fois vis-à-vis respectivement de AG et GG.

Une des caractéristiques des extraits bruts est leur richesse en phosphore labile, en acide nucléique et polysaccharides (essentiellement des mannanes) qu'il n'est pas aisé de séparer de la protéine enzymatique, les uns et les autres étant plus ou moins liés aux protéines.

Une des caractéristiques de l'amino-carboxypeptidase est sa beaucoup moins grande stabilité que l'aminopeptidase.

III. — *Étude de la fraction amino-carboxypeptidasique.*

Spécificité.

La fraction dipeptidasique purifiée est une amino-carboxypeptidase (elle n'hydrolyse pas les dipeptides N, C ou N—C substitués), présente une stéréospecificité *l* pour les deux acides aminés constitutifs du substrat, elle hydrolyse les glycyldipeptides plus rapidement que les alanyldipeptides correspondants. La présence d'un carboxyle libre en γ de la liaison sensible paraît avoir un effet inhibiteur.

Les dipeptides hydrolysés par la fraction purifiée, le sont également par les extraits bruts, il n'y a donc pas, au cours de la purification, fractionnement du matériel en amino-carboxypeptidases spécifiques des dipeptides étudiés.

Action des métaux.

Tous les métaux testés à l'exception de Mg, sont fortement inhibiteurs des activités AG et GL, en particulier Co, Mn et Fe qui sont au contraire fortement activateurs de l'activité GG.

Hg, Ag, Pb sont inhibiteurs des activités AG et, à un degré moindre, des activités GG. L'action inhibitrice non compétitive des métaux lourds, des oxydants (l'iode) et du parachloromercuribenzoate, réactif spécifique des *groupes thiols*, apporte la preuve que ceux-ci font partie des *groupes actifs de l'amino-carboxypeptidase.*

Action des complexants.

Le versène, l'orthophénantroline, l'hydroxy-8 quinoléine, les poly et métaphosphates, provoquent d'abord l'activation puis l'inhibition qui peut être totale des activités AG, GG, GL.

L'inhibition n'est pas compétitive et ce sont les sites de chélation des complexants qui en sont responsables. Un métal est donc nécessaire à l'activité de l'enzyme lequel lui est de plus fortement lié puisqu'il ne perd pas son activité au cours du processus de purification ou même après percolation sur résine cationique. Ces faits suggèrent fortement que l'amino-carboxypeptidase est un *métalloenzyme.*

L'amino-carboxypeptidase de *Saccharomyces cerevisiae ellipsoïdeus* est donc une *thiométalloenzyme* comme l'imidodipeptidase de Smith et par son inhibition par les complexants, se classe parmi les peptidases nombreuses qui nécessitent un métal pour leur activité.

Ce double caractère de thiométalloenzyme explique le paradoxe de son inhibition à la fois par les complexants et les métaux, il explique aussi l'allure originale en cloche de la courbe d'inhibition par les complexants qu'on ne retrouve pas pour la leucine-aminopeptidase ou la carboxypeptidase.

L'espèce du métal lié n'a pas été précisée pas plus d'ailleurs que l'affinité particulière de l'apoenzyme pour un métal donné car l'enzyme privé de la totalité du métal lié ne retrouve pratiquemment pas son activité en présence de différents métaux bien que la réversibilité de la combinaison métal-enzyme ait été vérifiée.

Tout se passe donc comme si l'élimination du métal modifiait profondément

la structure de l'enzyme le rendant plus instable ou empêchant ses centres actifs de rentrer en combinaison avec le substrat. Ce comportement constitue un argument supplémentaire de l'appartenance de l'amino-carboxypeptidase au groupe des « métalloenzymes » plutôt qu'à celui des complexes « métal-enzymes ».

La forte inhibition de AG par SNa_2 paraît indiquer que ce métal fait partie des métaux lourds, et nous avons montré que ce n'est pas le magnésium.

IV — *Recherche de la pluralité éventuelle du matériel isolé*

L'action des métaux Co, Mn, Fe, fait apparaître une différence fondamentale entre l'activité GG fortement activée et la plupart des autres activités fortement inhibées, AG en particulier.

La levure étudiée posséderait donc comme beaucoup d'autres matériels biologiques l'amino-carboxypeptidase désignée sous le nom de « glycylglycine-dipeptidase » sans que la preuve de son existence ait été faite.

La question est cependant importante de savoir si les métaux induisent un changement de spécificité de l'amino-carboxypeptidase ou au contraire s'il s'agit bien d'un enzyme distinct.

Nous n'avons pu apporter d'éléments de réponse à cette question en étudiant la réactivation de l'apoenzyme par différents métaux pour les raisons précisées plus haut.

Nous avons dès lors cherché à nous rendre compte si effectivement l'activité GG correspondait bien à un enzyme distinct de l'enzyme inhibé par Co et hydrolysant l'alanylglycine.

Le fait que l'amino-carboxypeptidase a les caractères d'un métalloenzyme donne un sens nouveau à l'activation de GG par Co qui signifie alors que le complexe métal-enzyme est aisément dissociable par le cobalt. Dans ce cas c'est la matrice protéique de l'enzyme qui est concernée et non l'affinité particulière de GG pour Co suivant l'hypothèse avancée par Smith.

De même l'inhibition de GG par Hg, Pb, Ag, I et PCMB, plus faible que celle de AG, paraît indiquer une moindre réactivité de ses groupes thiols actifs. Dans ce cas, ce serait aussi la matrice protéique de l'enzyme qui serait concernée.

La même interprétation peut être donnée de l'affinité moindre de l'activité GG pour les adsorbants et de son inclusion plus faible dans les gels de Sephadex.

Enfin l'activité GG diffère encore nettement de l'activité AG par la présence dans les extraits bruts de forts inhibiteurs sans effet sur AG.

Ces faits suggèrent la présence, dans le matériel isolé, de deux enzymes distincts dont l'un présente les caractères de la « glycylglycine-dipeptidase ».

Cependant les techniques faisant appel au fractionnement par les solvants organiques et le sulfate d'ammonium, à la chromatographie d'échanges d'ions (DEAE-cellulose) se sont révélées inefficaces pour l'isoler. Seule sa moindre affinité pour les adsorbants et les Sephadex a pu être mise à profit pour amorcer sa séparation par chromatographie sur hydroxylapatite et Sephadex G 200.

Les protéines des deux amino-carboxypeptidases ont donc des propriétés très voisines aussi bien du point de vue charge électrique (elles sont anioniques jusqu'au dernier pH testé 5,5) que solubilité et encombrement moléculaire (leur inclusion

faible mais significative dans Sephadex G 100 situe leur poids moléculaire approximativement aux environs de 100 000).

Au contraire la fraction aminopeptidasique diffère en tous ces points de la fraction dipeptidasique de la levure ce qui permet de les séparer aisément l'une de l'autre.

V — *L'aminopeptidase*

Ces recherches sur l'amino-carboxypeptidase de la levure nous ont conduit indirectement à identifier un matériel aminopeptidasique pour lequel un schéma de purification partielle a été décrit : il permet de l'obtenir concentré 25 fois par rapport aux extraits bruts et débarrassé de 95 p. 100 des protéines inactives et de 90 p. 100 de ses impuretés polysaccharidiques.

Quelques-unes de ses propriétés ont été décrites : il est inhibé non compétitivement par les métaux, il hydrolyse aussi la leucylglycine et son poids moléculaire est supérieur à celui de l'amino-carboxypeptidase.

L'ensemble de ces résultats apporte une contribution à nos connaissances très imprécises sur les amino-carboxypeptidases.

La technique de purification mise au point est un outil de travail en progrès notable sur les techniques précédemment décrites. Les résultats relatifs à l'aminopeptidase (purification et propriété) constituent un point de départ pour d'autres recherches.

RÉSUMÉ

Parmi les peptidases de *Saccharomyces Cerevisiae ellipsoïdeus* une aminopeptidase hydrolysant LG et une ou plusieurs amino-carboxypeptidases ont été identifiées.

Un procédé d'extraction et de purification de la fraction amino-carboxypeptidasique a été mis au point et quelques-unes de ses propriétés précisées.

C'est un métalloenzyme fortement anionique, possédant des groupes thiols parmi ses centres actifs et dont l'inclusion dans les gels de Sephadex G 100 et G 200 situe son poids moléculaire en première approximation aux environs de 100 000.

Il est doué d'une spécificité optique *l* et le comportement très différent de l'activité GG par rapport aux autres activités dipeptidasiques vis-à-vis des métaux, d'autres effecteurs, des adsorbants et des tamis moléculaires, suggère la présence de deux amino-carboxypeptidases. Mais il n'a pas été possible de les séparer tout au moins de façon préparative.

Indirectement un procédé d'extraction et de purification de l'aminopeptidase a été également mis au point et quelques-unes de ses propriétés précisées. Elle présente les caractères des leucyl-peptidases.

La levure étudiée présente en outre, des activités carboxypeptidasiques, endopeptidasiques et protéinasiques.

SUMMARY

INVESTIGATIONS INTO THE AMINOCARBOXYPEPTIDASE (DIPEPTIDASE) OF « SACCHAROMYCES CEREVISIAE »

A hydrolyzing aminopeptidase LG and one or more aminocarboxypeptidases have been identified among the peptidases of *Saccharomyces cerevisiae ellipsoïdens*.

A process for extracting and purifying the aminocarboxypeptidase fraction has been worked out and some of its properties determined.

It represents a metalloenzyme of strongly anionic character and contains thiol groups among its active centres, while its retention in Sephadex gels G 100 and G 200 places its molecular weight approximately in the region of 100 000.

The optical specificity is 1, while the very different behaviour of the GG activity by comparison with that of other dipeptidase activities towards metals, other effectors, adsorbents, and molecular sieves suggests the presence of two aminocarboxypeptidases. However, it has not been possible to separate these in preparative fashion.

An extraction and purification process of of the aminopeptidase has also indirectly been worked out, and several of its properties were determined. It displays the characteristics of leucine peptidases.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

ADAMS E., MC FADDEN M., SMITH E. L., 1952. *J. biol. Chem.*, **198**, 663.
ADAMS E., DAVIS N. C., SMITH E. L., 1952. *J. biol. Chem.*, **199**, 845.
ANSELL G. B., RICHTER D., 1954. *Biochim. Biophys. Acta.*, **13**, 92.
ANSON M. L., 1938. *J. gen. Physiol.*, **22**, 79.
AVERY G. S., LINDERSTROM-LANG K., 1938-1941. *C. R. Labo. Carlsberg Ser-Chim.*, **23**, 219.
AYAVON T., CRISTOL P., 1963. *C. R. Séances Soc. Biol.*, **157**, n° 2, 351.
BERGER J., JOHNSON M. J., PETERSON W. H., 1938. *J. Bacteriol.*, **36**, 521.
BERGER J., JOHNSON M. J., 1940. *J. biol. Chem.*, **133**, 639.
BERGER J., JOHNSON M. J., BAUMANN C. A., 1941. *J. biol. Chem.*, **137**, 389.
BERGMANN M., 1932. *Z. physiol. Chem.*, **212**, 72.
BERGMANN M., ZERVAS L., FRUTON J., SCHNEIDER F., SCHLEICH H., 1935. *J. biol. Chem.*, **109**, 325.
BINKLEY F., 1951. *Nature*, London, **167**, 888.
BINKLEY F., 1952. *Exper. Cell. Res., Suppl.* **2**, 145.
BODINE J. H., ALLEN T. H., 1938. *J. cell. comp. Physiol.*, **12**, 71.
BOSER H., 1955. *Z. physiol. Chem.*, **300**, 1.
BOTTELIER H. P., HOLTER H., LINDERSTROM-LANG K., 1941-1943. *C. R. Labo. Carlsberg Ser-Chim* **24**, 289.
BOURDET A., 1956. *Thèse Doc. Sciences*, Paris n° 2953.
CIFONELLI J. A., SMITH F., 1955. *Anal. Chem.*, **27**, 1639.
COLEMAN J., VALLEE B. L., 1960. *J. biol. Chem.*, **235**, 390.
COLEMAN J., VALLEE B. L., 1961. *J. biol. Chem.*, **236**, 2244.
CORDONNIER R., 1961. *Bull. Soc. Chim. biol.*, **43**, 1155.
CREWTHER W. G., LENNOX F. G., 1953. Austral. *J. biol. Sci.*, **6**, 410.
DAVIS N. C., SMITH E. L., 1953. *J. biol. Chem.*, **200**, 373.
DAVIS N. C., SMITH E. L., 1957. *J. biol. Chem.*, **224**, 261.
DERNBY K. G., 1917. *Biochem. Z.*, **81**, 107.
ELLIOTT S. D., 1950. *J. Exper. Med.*, **92**, 201.
FÉLIX F., LABOUESSE-MERCOUROFF J., 1956. *Biochim. Biophys. Acta*, **21**, 303.
FÉLIX F., BROUILLET N., 1960. *Bull. Soc. Chim. biol.*, **42**, 699.
FÉLIX F., BROUILLET N., 1966. *Biochim. Biophys. Acta*, **122**, 127-144.

Fischer E. H., Kohtis L., 1951. *Helvetica Chimica Acta*, **34**, 1123.
Folk J. E., Gladner J. A., 1960. *J. biol. Chem.*, **235**, 60.
Frieden C., 1958. *Biochem. Biophys. Acta*, **27**, 431.
Fruton J. S., Smith V. A., Driscoll P. E., 1948. *J. biol. Chem.*, **173**, 457.
Gailey F. B., Johnson M. J., 1941. *J. biol. Chem.*, **141**, 921.
Gainor C., Crisley F. D., 1961. *Nature*, London, **190**, 1031.
Glazer A. N., Wellner D., 1962. *Nature*, London, **194**, 862.
Gorini L., Lanzavecchia G., 1954. *Biochim. Biophys. Acta*, **15**, 399.
Grassmann W., 1927. *Z. physiol. Chem.*, **167**, 202.
Grassmann W., Dyckerhoff H., 1928 *a*. *Z. physiol. Chem.*, **175**, 18.
Grassmann W., Dyckerhoff H., 1928 *b*. *Z. physiol. Chem.*, **179**, 41.
Grassmann W., Heyde W., 1929. *Z. physiol. Chem.*, **183**, 32.
Grassmann W., Dyckerhoff H., Schoenebeck O., 1929. *Ber. Chem. Ges.*, **62**, 1307.
Grassmann W., Klenk L., 1930. *Z. physiol. Chem.*, **186**, 26.
Grassmann W., Dyckerhoff H., Schoenebeck O., 1930. *Z. physiol. Chem.*, **186**, 183.
Grassmann W., Eibeler H., Schoenebeck O., 1931. *Z. physiol. Chem.*, **194**, 124.
Grassmann W., Dyckerhoff H., 1933. *Z. physiol. Chem.*, **214**, 187.
Grassmann W., Emden L., Schneller H., 1934. *Biochem. Z.*, **271**, 216.
Grassmann W., Volmer W., Windbichler V., 1938. *Biochem. Z.*, **298**, 8.
Green N. M., Neurath H., In Neurath H., Bailey K., 1954. *The Proteins*, vol. II part. B., 1067 Acad. Press , New- York.
Halvorson H., 1958-*a*. *Biochim. Biophys. Acta.*, **27**, 267.
Halvorson H., 1958-*b*. *Biochim. Biophys. Acta.*, **27**, 255.
Hanson T. H., Smith E. L., 1949. *J. biol. Chem.*, **179**, 789.
Hecht M., Civin H., 1936. *J. biol. Chem.*, **116**, 477.
Hoffmann T., Schaw R., 1964. *Biochim. Biophys. Acta*, **92**, 543.
Hogness D. S., Cohn M., Monod J., 1955. *Biochim., Biophys., Acta*, **16**, 99.
Hooper K. C., 1964. *Biochem.*, J. **90**, 584.
Jensen P. K., Lehmann F. E., Weber R., 1956. *Helv. Physiol. Pharmacol. Acta*, **14**, 188.
Johnson M. J., Berger J., 1939. *J. biol. Chem.*, **130**, 641.
Johnson M. J., 1941. *J. biol. Chem.*, **137**, 575.
Johnson M. J., Berger J., 1942. In Nord F. F., *Adv. in enzymology* vol. II, 81, Intersci. Publ. New York. and London.
Kägi J. H. R., 1959. *Federation Proc.* **18**, 484.
Keller P. J., Cohen E., Neurath H., 1958. *J. biol. Chem.*, **233**, 344.
Khouvine Y., Robichon H., 1953. *Bull. Soc. Chim. biol.*, **35**, 945.
Lenney J. F., 1956. *J. biol. Chem.*, **221**, 919.
Linderstrom-Lang K., 1927. *C. R. Trav. Lab. Carlsberg Ser-Chim.*, **17**, n° 4, 1.
Linderstrom-Lang K., 1929. *Physiol. Chem.*, **182**, 151.
Loughlin R. E., Trikojus V. M., 1964. *Biochim. Biophys. Acta*, **92**, 529.
Lowry O. H., Rosebrough N. J., Farr A. L., Randall R. J., 1951. *J. biol. Chem.* **193**, 265.
Macrae T. F., 1933. *Biochem. J.*, **27**, 1229.
Marchis-Mouren G., Charles M., Ben Abdeljlil A., Desnuelle P., 1961. *Biochim. Biophys, Acta*, **50**, 186.
Marks N., Lajtha A., 1963. *Biochem. J.*, **89**, 438.
Maschmann E., 1943-a. *Naturwiss*, **31**, 136.
Maschmann E., 1943-b. *Biochem. Z.*, **319**, 129.
Matheson A. T., Hanes C. S., 1959. *Biochim. Biophys. Acta*, **33**, 292.
Matheson A. T., 1963. *Canad. J. Biochem. Physiol.*, **41**, 9.
Matheson A. T., Bjerre S., Hanes C. S., 1963. *Canad. J. Biochem. Physiol.*, **41**, 9.
Mc Donald M., Kunitz M., 1941. J. *Gen-Physiol.*, **25**, 53.
Najjar V. A., 1951 In Mc Elroy W. D., Glass B., *Phosphorus metabolism*, vol. I, 500, The Johns Hopkins Press. Baltimore.
Neurath H., 1960 In Sumner J. B., Myrback K., *The enzymes*, vol. 4, II, Acad. Press, New York. (2e éd.).
Nguyen Van Thoai M., 1950. *Bull. Soc. Chim. biol.*, **32**, 7.
Nishi A., 1958. *J. Biochem.* Tokyo, **45**, 991.
Northcote D. H., Horne R. W., 1952. *Biochem.*, J., **51**, 232.

Olson C. K., Binkley ., 1950. *J. biol. Chem.*, **186**, 731.
Patterson E. K., 1957. *Federation Proc.*, **16**, 231.
Patterson E. K., Shu-Hsi-Hsia, Keppel A., Sorof S., 1965. *J. biol. Chem.*, **240**, 710.
Pope A., Anginsen C. B., 1948. *J. biol. Chem.*, **173**, 305.
Price V. E., Meister A., Gilbert J. B., Greenstein J. P., 1949. *J. biol. Chem.*, **181**, 535.
Rabin B. R., Crook E. M., 1956. *Biochim. Biophys. Acta*, **19**, 550.
Rabin B. R., 1960. *Bull. Soc. Chim. biol.*, **42**, 1247.
Rademacker W., Soons J. B. J., 1957. *Biochim. Biophys. Acta*, **24**, 451.
Reinartz F., Hug G., 1957. *Naturwiss*, **44**, 234.
Robinson D. S., Birnbaum S. M., Greenstein J. S., 1953. *J. biol. Chem.*, **202**, 1.
Robinson G. B., Schaw B., 1960. *Biochem., J.*, **77**, 351.
Robinson G. B., 1963. *Biochem., J.* **88**, 162.
Rotman B., Spiegelman S., 1954. *J. Bacteriol.*, **68**, 419.
Rupley J. A., Neurath H., 1960. *J. biol. Chem.*, **235**, 609.
Salvidio E., Urbani E., 1953. *Haematologica*, **37**, 1001.
Schales O., Roux R., 1950. *J. biol. Chem.*, **182**, 569.
Schneider F., Graaf, 1940-1941. *Biochem. Z.*, **307**, 249.
Schoenheimer R., 1942. *The dynamic state of Body constituents*. Harvad Univ. Press, Cambridge, Mass.
Semenza G., 1957. *Biochim. Biophys. Acta*, **24**, 401.
Sevag M. G., Lackmann D. B., Smollens J., 1938. *J. biol. Chem.*, **124**, 425.
Smith E. L. Bergmann M., 1944. *J. biol. Chem.*, **153**, 627.
Smith E. L., 1946. *J. biol. Chem.*, **163**, 15.
Smith E. L., 1948- *a*. *J. biol. Chem.*, **173**, 571.
Smith E. L., 1948- *b*. *J. biol. Chem.*, **176**, 9.
Smith E. L., 1948- *c*. *J. biol. Chem.*, **176**, 21.
Smith E. L., 1948- *d*. *J. biol. Chem.*, **173**, 553.
Smith E. L., Polglase W. J., 1948. *J. biol. Chem.*, **180**, 1209.
Smith E. L., Spackman D. H., 1955. *J. biol. Chem.*, **212**, 271.
Smith E. L., 1960. In Sumner J. B., Myrback K., *The enzymes*, vol. 4, 8, 2e éd. Acad. Press, New York.
Stein E. A., Fischer E. H., 1960. *Biochim. Biophys. Acta*, **39**, 287.
Strain H., 1939. *Enzymologia*, **7**, 133.
Sylven B., Malmgren H., 1957. *Acta Radiologica Suppl.*, **154**.
Sylven B., Tobias C. A., Malgren H., Ottoson R., Thorell B., 1959. *Exper. Cell. Res.*, **16**, 75.
Sylven B., Bois I., 1960. *Cancer Res.*, **20**, 831.
Tarver A., 1954 In Neurath H., Bailey K., *The Proteins*, vol. II, part. B, 1199, Acad. Press, New York.
Tiselius M., 1956. *Archem. Biochem. Biophys.*, **65**, 132.
Togasawa Y., 1957. *Bull. Japan Soc. Sci. Fish.*, **23**, nº 2, 105.
Togasawa Y., Katsumata T., 1957. *Bull. Japan Soc. Sci. Fish.*, **23**, nº 3, 163.
Togasawa Y., Katsumata T., 1958. *Bull. Japan Soc. Sci., Fish.*, **23**, nº 10, 625.
Uzman L. L., Rumley M. K., Van Der Noort S., 1960. *Nature*, London, **186**, 559.
Vallee B. L., Neurath H., 1954. *J. amer. chem. Soc.*, **76**, 5006.
Vallee B. L., 1955 In Anson M. L., Bailey K., Edsall J. T., *Adv. in protein chemistry*, vol. X, 318-378, Acad. Press. New York.
Vallee B. L., Neurath H., 1955. *J. biol. Chem.* **217**, 253.
Vallee B. L., Hoch, 1955. *Proc. nation Acad. Sci. U. S. A.*, **41**, 327.
Vallee B. L., Rupley J. A., Coombs T. L., 1960. *J. biol. Chem.*, **235**, 64.
Vallee B. L., 1960. In Sumner J. B., Myrback K., *The enzymes*, vol. 3, part. B, 225-276, 2e éd., Acad. Press. New York.
Vescia A., 1956. *Biochem. Biophys. Acta*, **19**, 175.
Vescia A., Traniello S., 1962. *Bull. Soc. ital. Biol. Sper.*, **38**, 637.
Vines S. H., 1903. *Ann. Bot.*, **17**, 237.
Waldschmidt Leitz E., Purr A., 1929. *Ber. Chem. Ges.*, **62**, 956.
Weissmann G., Dingle J., 1961. *Exper. Cell. Res.*, **25**, 207.
Wilcox H. G., Fried M., 1963. *Biochem. J.*, **87**, 192.
Williamson W. T., Tove S. B., Speck M., 1964. *J. Bacteriol*, **87**, 49.
Willstätter R., Grassmann W., 1926. *Z. physiol. Chem.*, **153**, 250.

DEUXIÈME THÈSE

Propositions données par la Faculté

SPÉCIFICITÉ ET CLASSIFICATION DES ENZYMES PROTÉOLYTIQUES

VU ET APPROUVÉ :

Marseille, le 18 mai 1966
Le Doyen,
P. ROUARD

VU ET PERMIS D'IMPRIMER :

Aix-en-Provence, le 26 mai 1966
Le Recteur,
P. GUILLON

Imprimerie Bussière à Saint-Amand (Cher), France. — 3-1967.

Dépôt légal : 1e trimestre 1967. N° d'impression: 1610.